Aus der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Wullstein

SPEKTRALANALYTISCHE UNTERSUCHUNG DES STEIGBÜGELS UNTER VERWENDUNG EINER LASER - MIKROSONDE

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Ekkehard Schlichtenhorst
aus Uelzen

Würzburg 1970

Aus der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Wullstein

SPEKTRALANALYTISCHE UNTERSUCHUNG DES STEIGBÜGELS UNTER VERWENDUNG EINER LASER - MIKROSONDE

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Ekkehard Schlichtenhorst

aus Uelzen

Würzburg 1970

Referent: Prof. Dr.med. H. Wullstein

Tag der Promotion:

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

FÜR FRIEDERIKE

INHALTSÜBERSICHT

SPEKTRALANALYTISCHE UNTERSUCHUNG DES STEIGBÜGELS

UNTER VERWENDUNG EINER LASER - MIKROSONDE

	Seite
I. Einleitung	1
II. Problemstellung und Literaturübersicht	2
A. Das Problem: Otosklerose	2
B. Mineral- und Spurenelemente	3
C. Die LASER - Mikrosonde	12
III. Eigene Untersuchungen	13
A. Apparative Hilfsmittel	13
B. Material und Methodik	15
C. Standardermittlung	23
D. Untersuchungsergebnisse	28
IV. Diskussion	59
V. Zusammenfassung	62
VI. Schrifttum	63

I. EINLEITUNG

Die knöcherne Labyrinthkapsel nimmt als embryonales Gewebe auch im erwachsenen Organismus eine Sonderstellung ein. Gelegentlich kommt es jedoch gerade in diesem Knochen zu einer starken Umbauaktivität, die sich histologisch nachweisen lässt und klinisch als Otosklerose manifestiert.

Über die histologischen und klinischen Erscheinungsformen dieser Erkrankung sind schon zahlreiche Arbeiten veröffentlicht worden. Auch haben histochemische Untersuchungen in den vergangenen Jahren zu wertvollen Erkenntnissen geführt.

Da über die Mineralien des otosklerotischen Knochens nur sehr wenig und über die Spurenelemente fast gar nichts bekannt ist, scheint eine Überprüfung der diesbezüglichen Verhältnisse sinnvoll.

II. PROBLEMSTELLUNG UND LITERATURÜBERSICHT

A. Das Problem: Otosklerose
(4 , 5 , 6 , 12 , 16 , 17 , 23 , 24 , 29)

Die Otosklerose wird von manchen Autoren als die am häufigsten auftretende Ohrerkrankung angesehen. Besonders bei der weißen Rasse kann dieses Leiden bereits als Volkskrankheit aufgefaßt werden, das aufgrund seiner erblichen Komponente und der steigenden Lebenserwartung eine noch weitere Verbreitung finden dürfte.

Statistischen Untersuchungen zufolge läßt sich eine Otosklerose bei 7 - 10% aller Weißen histologisch nachweisen, zur Schwerhörigkeit infolge einer Stapes-Ankylose kommt es freilich nur in etwa 1,2%. Die Fixation des Steigbügels im ovalen Fenster erfolgt in 26% fibrös, in 38% durch Kompression und Luxation sowie in 36% durch knöcherne Verbindung. Letztere Art der Fixation ist für den Forscher besonders wertvoll, da ihm durch die Stapedektomie-Operation die Möglichkeit gegeben wird, otosklerotische Foci lebender Patienten im bzw. am Stapes selbst zu untersuchen.

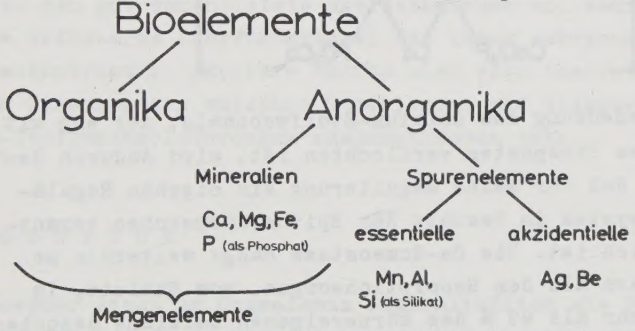
Obwohl mit Recht angenommen werden darf, daß die histologischen und biochemischen Prozesse des Stapes denen der knöchernen Labyrinthkapsel voll entsprechen, herrscht noch keine Klarheit über die Pathogenese der Otosklerose. Mit der Histologie kann auch nur das jeweilige Stadium beschrieben werden, die Zuordnung verschiedener Stadien in eine zeitliche Reihenfolge erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit, aber der eigentlich auslösende Faktor läßt sich mit dieser Methode allein nicht finden, nur vermuten. Deshalb müssen neue Wege gefunden werden, um die Möglichkeiten einzugrenzen. Die vorgelegte Arbeit soll dazu beitragen.

B. Mineral- und Spurenelemente

(3 , 7 , 8 , 13 , 15 , 20 , 21 , 22 , 28)

Nach BERSIN können die den Körper aufbauenden Bioelemente unterteilt werden in Organika und Anorganika, wobei sich letztere in Mineralien und Spurenelemente aufgliedern. Während Organika und Mineralien zur Gruppe der Mengenelemente zusammengefaßt werden können, unterscheiden sich die Spurenelemente nach ihrer biochemischen Eigenschaft in essentielle und akzidentielle.

Folgendes Schema ordnet die in vorliegender Arbeit untersuchten Elemente nach diesen Gesichtspunkten ein:

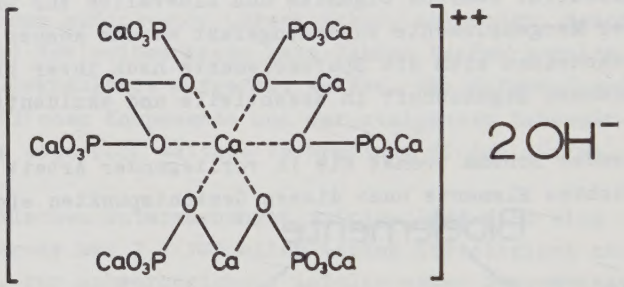


Nun sollen die einzelnen Elemente kurz ihrer biologischen Bedeutung nach charakterisiert und speziell auf ihren Anteil an der Knochenphysiologie untersucht werden.

C A L Z I U M

Calzium stellt das biochemisch wie quantitativ wichtigste Mineral des Säugetierorganismus dar. Bei einem Anteil von 1,5 - 2,0 % im menschlichen Körper beeinflußt es zahlreiche fundamentale Vorgänge wie Nukleinsäurebindungen, Grenzflächen-Permeabilitäten und Enzymaktivitäten, um nur einige Beispiele anzudeuten.

Die augenfälligste Rolle spielt das Calzium als Baustein des knochenbildenden Hydroxylapatits, welches in Form von Kristalliten entlang den Kollagen-Fibrillen der organischen Matrix des Knochens angeordnet ist. In der fettfreien Grundsubstanz des Knochens ist Calzium mit 11 - 25 % beteiligt.



Die Bedeutung des Calzium-Stoffwechsels, der eng mit dem des Phosphates verflochten ist, wird dadurch deutlich, daß für seine Regulierung ein eigenes Regulationssystem in Gestalt der Epithelkörperchen verantwortlich ist. Die Ca-Homeostase hängt weiterhin ab vom Darm als dem Resorptionsorgan, vom Skelett, in dem mehr als 99 % des körpereigenen Calziums deponiert sind, und von der Niere als seinem Ausscheidungsorgan. Das Parathormon greift dabei am Knochen durch angeregte Osteoklastentätigkeit und an der Niere durch verstärkte Hemmung der tubulären Rückresorption des Phosphates ein. Außerdem haben Einfluß auf den Ca-Haushalt die Ernährungsweise, der Vit.-D-Stoffwechsel und Glucocorticoide der Nebennierenrinde. Im Ganzen also beruht das ungestörte Calzium-Phosphat-Gleichgewicht auf einem generalisierten Rückkopplungsmechanismus.

Zur Erhaltung dieses Gleichgewichtes hat der Skelettknochen als Depotorgan eine entscheidende Funktion zu

erfüllen. Da die flachen Hydroxylapatit-Kristallite - man spricht von 50 μ Dicke und einigen 100 μ Länge - eine große Oberfläche (ca. 200 m^3/g Knochenkompakta) aufweisen, bietet sich hier eine gute Austauschmöglichkeit für Minerälien an. Zudem sind an der Oberfläche noch Ca^{++}- und PO_4^{---}- Ionen locker gebunden, die einen labilen, leicht austauschbaren Mineralanteil darstellen und somit als Puffer eine Art Schutzfunktion gegen Knochenresorption innehaben dürften.

Störungen des Ca-Haushaltes können somit vom Knochen zunächst ausgeglichen werden. Allerdings bietet sich dazu der gut durchblutete Skelettknochen an, weniger die Gefäß-arme Labyrinthkapsel mit ihrer embryonalen Gewebsstruktur. Insofern dürfte also rein theoretisch ein Zusammenhang zwischen Otosklerose und allgemeinen Ca-Stoffwechselstörongen auszuschließen sein.

P H O S P H O R

Phosphor liegt im Organismus ausschließlich als Phosphat vor und dient als solches praktisch allen Stoffwechselvorgängen, die zur Konservierung oder Übertragung von Energie ablaufen. Eine ebenso wichtige Funktion wie das Calzium nimmt es ein beim Aufbau des Knochenminerals. Während sein Anteil am menschlichen Körper ca. 1,16 % beträgt, ist der der fettfreien Grundsubstanz des Knochens mit 5,6 - 14 % Phosphor zu veranschlagen.

Die Knochenbildung ist in den Anfangsstadien eng gekoppelt an Kollagenfibrillen, deren interfibrilläre Mucopolysaccharid-Komplexe als Ionenfänger fungieren. Eine $CaPO_4$-Ausfällung ist freilich zunächst nicht

möglich, weil sie in Weichgeweben durch einen Hemmstoff verhindert wird. FLEISCH konnte einen solchen Inhibitor aus Plasma und Urin isolieren und als anorganisches Pyrophosphat identifizieren. Tierversuche zeigten, daß Pyrophosphat eine Vit.D-induzierte Aortenverkalkung der Ratte zu hemmen vermochte. Diese Ergebnisse sowie solche aus weiteren in vitro-Versuchen lassen FLEISCH vermuten, daß das anorganische Pyrophosphat, an Kollagen gebunden, eine bei den Calzium- und Phosphat-Konzentrationen der extrazellulären Flüssigkeit sonst mögliche Apatitbildung verhindert. Im mineralisierenden Gewebe dagegen besteht eine hohe Konzentration an Pyrophosphatase, die befähigt ist, das Pyrophosphat zu zerstören und eine Verkalkung einzuleiten.

Das so abgelagerte Mineral hat Kristallstruktur mit den kristallographischen Eigenschaften des Hydroxylapatits (siehe auch Abschnitt Calzium). Die chemische Zusammensetzung der anorganischen Anteile des Knochens stimmt jedoch nicht vollständig mit der des Hydroxyl-Apatits überein. Erklärbar ist diese Abweichung durch heteroionischen Austausch einzelner Gruppen. So können beispielsweise Wasserstoff, Strontium, Blei, Magnesium oder Natrium Calzium ersetzen, Phosphat kann gegen Sulfat oder Carbonat ausgetauscht werden, Fluor das Hydroxyl verdrängen. Außerdem muß in diesem Zusammenhang das auf der Kristalloberfläche locker gebundene Calzium und Phosphat (bzw. Pyrophosphat, wie FLEISCH vermutet) Erwähnung finden. Weiterhin könnte ein Alterungsprozess der Kristallite in Form einer Strukturveränderung für die Abweichung von der reinen Apatitzusammensetzung verantwortlich sein.

M A G N E S I U M

Magnesium wird als lebensnotwendiges intracelluläres Biokation für alle Tiere und Pflanzen an ATP-katalysierenden, enzymatischen Reaktionen beteiligt. Hauptsächlich mit dem Chlorophyll der Nahrung gelangt es über den Dünndarm in den Organismus, in dem es zu ca. 50 % im Knochen gespeichert wird.

Der menschliche Körper enthält etwa 0,04 % dieses Elementes, im Knochen sind ca. 0,1 % zu finden, sein Anteil an den Knochenmineralien wird mit 0,45 - 0,7 % angegeben.

Bei manchen Stoffwechselvorgängen kann Magnesium in begrenztem Maße gegen Calzium ausgetauscht werden, wie es z. B. vom Apatit bekannt ist. Daher rührt wohl auch der hohe Mg-Anteil des Knochens. Andererseits können Mg und Ca antagonistisch wirken, wie man von ihrem Einfluß auf die ATP-ase weiß. Dennoch scheint die Regulation beider Elemente verschiedenen Mechanismen unterworfen zu sein.

E I S E N

Das Eisen kommt im menschlichen Organismus sowohl in zweiwertiger als auch in dreiwertiger Form vor. Seine biochemische Bedeutung ist vor allem als Baustein der respiratorischen Elemente wie Hämoglobin und Myoglobin zu suchen. Bei einem Gehalt von 5 bis 8 g Eisen im Erwachsenen beträgt sein Anteil ca. 0,01 %.

Bezüglich des Knochenstoffwechsels kommt ihm keine wesentliche Bedeutung zu, wenn davon abgesehen wird,

daß für eine ordnungsgemäße Ernährung des Knochens natürlich auch Hämoglobin notwendig ist. Im Knochenmark des Skelettknochens befindet sich zudem gleichsam als Gastorgan das blutbildende Gewebe, in dem das Eisen als Apoferritin-Ferritin deponiert und während der Erythropoese in die Erythrocyten eingebaut wird.

In der zu untersuchenden Labyrinthkapsel finden all diese Vorgänge normaliter nicht statt, ja selbst die Ernährung dieses Knochens scheint auf ein Minimum beschränkt zu sein.

A L U M I N I U M

Das praktisch ubiquitär vorkommende Aluminium hat in der Medizin vor allem durch die Schädigung des Organismus Bedeutung erlangt. Aluminium ist ein regelmäßig vorkommendes Spurenelement mit fraglicher biologischer Bedeutung. Im menschlichen Körper ist es zu ca. 0,001 % zu finden, im Knochen zu 0,24 - 0,5 %.

Tierexperimentell fand sich bei Ratten per os zugeführtes Aluminium vorwiegend in Leber, Knochen und Gehirn. Beim Menschen ist als Eintrittspforte besonders die Lunge von Wichtigkeit, in der Al-Verbindungen eine sog. fibrogenetische Wirkung zeigen. Diese führen zu Atemnot und chronischen Bronchitiden, aber auch gastrointestinale Störungen sind bekannt. Auffallend ist eine enge Beziehung zwischen Al-Gehalt und der Aortensklerose im Alter.

Nach schweren Intoxikationen mit Al-Verbindungen kann es zu Osteomalazie und Pseudofrakturen kommen. Vermutlich hängt diese Erscheinung mit der Fähigkeit des

Aluminiums zusammen, Phosphat des Apatits in großen Mengen zu dekorporieren und Enzyme der oxydativen Phosphorylierung zu stören. Die genauen Vorgänge sind jedoch noch nicht bekannt.

M A N G A N

Mangan gehört zu den regelmäßig vorkommenden Spurenelementen mit erwiesener Lebenswichtigkeit. Während der menschliche Körper zu 0,001 % Mangan enthält, beträgt sein Anteil im Knochen 0,15 - 0,3 %. Von Phosphaten und ähnlichen sauren Gruppen gebunden wird es im Organismus gespeichert. Diese Annahme wird mit seinem den Erdalkalien ähnelnden biochemischen Verhalten begründet. Speicherorgane sind vorwiegend Leber, Pankreas und Nieren.

Bezüglich seiner physiologischen Bedeutung ist vor allem sein Einfluß auf diverse enzymatische Reaktionen hervorzuheben, bei denen es gelegentlich mit Magnesium und Calzium konkurriert. Mn-Überschuß, wie er bei gewerblichen Mn-Vergiftungen auftritt, führt nach jahrelanger Exposition zu Neuropathien. Der Grund dieser allerdings stark dispositionsabhängigen Erkrankung ist offenbar in der Blockierung zellständiger Enzyme zu suchen.

Mn-Mangelerscheinungen sind im Tierexperiment untersucht worden. Hiervon sind besonders calzifizierende Gewebe junger Tiere betroffen. Mn- und Ca-armes Futter führte zu Osteoporose-ähnlichen Knochenabnormitäten, während sich durch geringe Mangan-Gaben die Verkalkung erheblich verbessern liess.

Mangan hilft also besonders bei Ca-armer Kost die geringen Mengen zur Verfügung stehenden Calziums vollständig auszunutzen und somit eine ordnungsgemäße Calzifizierung zu gewährleisten.

S I L I Z I U M

Ebenso wie Mangan ist das Silizium zu den lebenswichtigen Spurenelementen zu zählen. Im menschlichen Körper ist es zu ca. 0,002 % enthalten.

Unter normalen Umständen findet es sich besonders in der Haut und ihren Anhangsgebilden, der Aorta, in Muskulatur und Sehnen, sowie in den Nieren. Möglicherweise beteiligen sich Silikate an der Keratinisierung der Haut.

Während über Si-Mangelerkrankungen nichts bekannt geworden ist, können Überschußreaktionen schwerwiegende Folgen zeitigen. So führt die übermäßige Aufnahme löslicher Silikate durch Enzymstörungen zur Hämolyse. Das wichtigste durch Silizium hervorgerufene Leiden ist jedoch die Silicose. Die aus Quarz-Staubpartikeln successive in Lösung gehende Kieselsäure entfaltet hierbei in der Lunge eine sog. fibrogenetische Wirkung.

Die Zusammenhänge zwischen Silizium und Knochen sind bisher nicht untersucht worden.

S I L B E R

Silber gehört zu den ausschließlich akzidentiellen

Spurenelementen, deren Stoffwechselbedeutung völlig ungewiß ist. Möglicherweise konkurriert es zusammen mit Gold um das lebenswichtige Kupfer. Die Silberkonzentration der verschiedenen Organe schwankt zwischen 0,1 und 2,0 µg/g Asche. Der Gehalt im Rippenknochen wird mit 0,01 % angegeben.

Von medizinischer Bedeutung sind lediglich iatrogen bedingte oder rein akzidentielle Überschußreaktionen, die sich meist als Argyrosen der Haut darstellen.

B E R Y L L I U M

Auch Beryllium ist als ausschließlich akzidentielles Spurenelement anzusehen, das jedoch in höherer Konzentration eingeatmet eine extrem toxische Wirkung entfaltet. In größeren Mengen eingeatmete Be-haltige Luft führt zu chronisch verlaufenden Berylliosen mit gelegentlich tödlichem Ausgang. Der MAK-Wert ist demnach auf 0,002 mg Be/m^3 Luft festgelegt worden. Die Schädigung des Lungengewebes äußert sich in charakteristischen Granulom-Bildungen.

Lösliche Beryllium-Salze bilden im Körper schwerlösliche Phosphate und Hydroxyde, woraus die besondere Affinität zum Knochen ersichtlich wird, in dem etwa 50 % des retinierten Berylliums gehalten werden. Aber auch in blutbildenden Organen konnte eine lange Verweildauer festgestellt werden. Die Toxizität dürfte hier wegen der Schwerlöslichkeit der Salze im Gegensatz zu den Lungengranulomen nur gering sein.

C. Die LASER - Mikrosonde

(1 , 2 , 9 , 10 , 11 , 14 , 18 , 19 , 20 , 25 , 26 , 27)

Seit den ersten erfolgreichen Experimenten mit den LASER - Strahlen im Jahre 1961 konnten mannigfaltige neue Anwendungsbereiche in Wissenschaft und Forschung erschlossen werden. Die hier beschriebene Anordnung wurde erstmalig im Jahre 1963 vorgestellt, der zunächst verwendete Rubin-LASER später jedoch durch den leistungsstärkeren Glas-Nd-LASER ersetzt.

Die mit diesem Gerät mögliche, bis dahin nicht gekannte Empfindlichkeit in der anorganischen Mikrochemie kam auch der medizinischen Forschung zugute. Gerade die Möglichkeit, Spurenelemente im Nanogramm-Bereich nachzuweisen, ist im Zusammenhang mit der Histochemie als ein großer Fortschritt zu werten. An dieser Stelle sei nur darauf hingewiesen, daß heute die Diagnose einer Berylliose durch LASER-mikroanalytische Untersuchungen histologischer Schnitte gesichert werden kann, was mit herkömmlichen chemischen Methoden nur bei massiven Beryllium-Intoxikationen erreichbar gewesen ist.

So klar und einfach die Arbeit mit der LASER - Mikrosonde auch erscheinen mag, so wird bei Durchsicht der bisher erschienenen Veröffentlichungen doch deutlich, daß exakte, quantitative Ergebnisse bisher nicht aufgezeigt werden konnten. Der Grund hierfür ist in der enormen Schwierigkeit zu suchen, eine gültige Korrelation zwischen verdampfter Substanz und Linien-Intensität zu finden. Und tatsächlich galt es bei bei der Ermittlung der Eichkurven auch in der vorliegenden Arbeit die größten Hindernisse zu überwinden.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Apparative Hilfsmittel

(10 , 11 , 14)

Technische Geräte von der Art der hier vorgestellten LASER - Mikrosonde stehen der chemischen Mikroanalytik erst seit kurzem zur Verfügung.

Zur Emissions-Spktralanalyse nichtleitender Substanzen war es bisher erforderlich, das Probenmaterial zu pulverisieren und mit einer leitenden Matrix zu vermischen. Organische Proben konnten zudem nur nach vorheriger Veraschung untersucht werden. Mit der LASER - Mikrosonde erübrigen sich derart aufwendige Präparationstechniken.

Bei dem zur Verfügung stehenden Gerät handelt es sich um einen Neodym-dotierten Glas-LASER, der seine Auflade-Energie über das Pumplicht einer Xenon-Blitzlampe bezieht. Dem Nd-Glas-Stab ist hinter einer Blende der sog. OPTUL (Optical Pulse Transmitter Using Laser) adjustiert, der als rotierender Halbspiegel eine reflektorische Potenzierung der LASER-Energie sowie eine zeitliche Beschneidung der Strahlung auf 1 - 2 millisec. bewirkt (sog. Q-switch). Über eine unverkittete Quarzoptik wird der Strahl fokussiert.

Mit Hilfe eines Binokulars (3 x 15-fach) läßt sich die zu untersuchende Probe nach einem Fadenkreuz exakt im Fokus einstellen. Je nach Ausgangsenergie des LASER (0,25 - 1,0 Joule) und Wahl der Blende (2,7 - 7,9 mm Ø) wird unterschiedlich viel Proben-

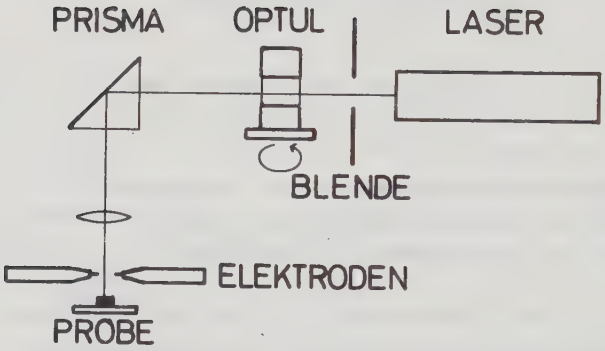


Abb. 1 : Schematischer Aufbau der LASER-Mikrosonde

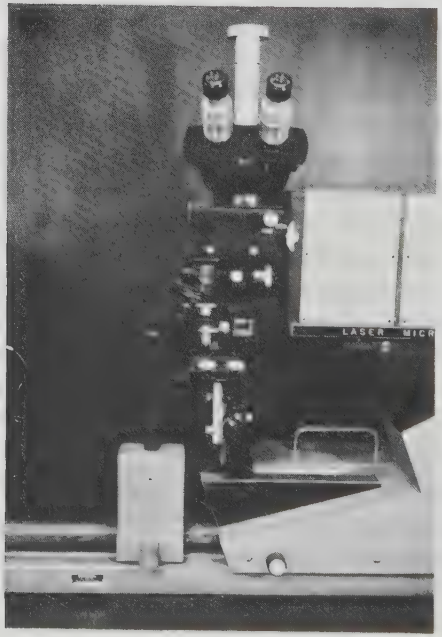


Abb. 2 : Die LASER-Mikrosonde

material verdampft, welches als ionisierte Wolke bei einer Temperatur von 5 - 20 000° K in einem Spannungsfeld von 2 - 2 500 Volt zwischen zwei Graphit-Elektroden zur Entladung gebracht wird. Diese sind 1,5 bis 2,0 mm über der Probe und in einem Abstand von ca. 1,5 mm zueinander angeordnet.

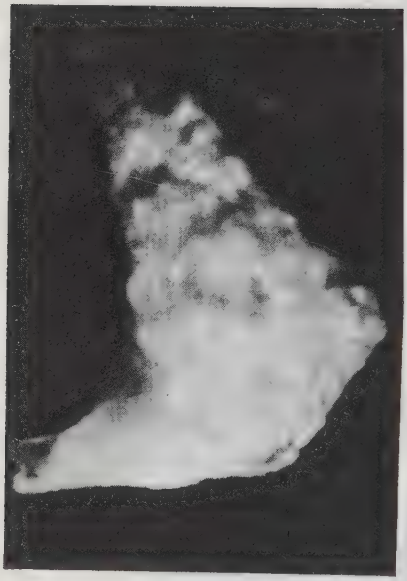
Der Entladungsblitz wird über einen nachgeschalteten 1,5 m - Wadsworth-Gitterspektrographen als Funken-Emissionsspektrum auf Kodakfilm 103-o registriert. Das Spektrum umfasst bei einer Länge von ca. 50 cm einen Wellenlängenbereich von 2100 bis 7600 Ångström. Das bedeutet eine Dispersion von 10,9 Å/mm bei einer Auflösung von 0,1 Å.

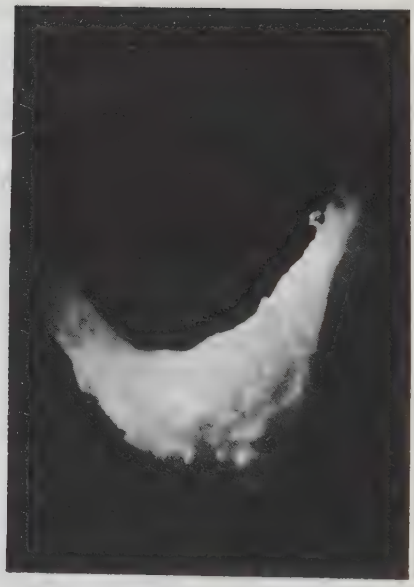
Die Auswertung der gewonnenen Spektren erfolgt über ein Mikrophotometer mit synchron-motorischem Filmvorschub auf einem linearen Kompensationsschreiber. Die weitere mathematische Verwertung der Ergebnisse besorgen eine elektronische Tisch-Rechenmaschine und eine Groß-Rechenanlage.

B. Material und Methodik

(10 , 11 , 14)

Zur Untersuchung kamen per Stapedektomie gewonnene Steigbügel klinisch manifester Otosklerotiker, die in den Jahren 1966 bis 1969 in der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Würzburg (Direktor: Prof. Dr.med. H. Wullstein) operiert worden waren. Die Präparate gelangten auf direktem Wege aus den Operationsräumen in die Laboratorien und wurden hier zunächst eingefroren.





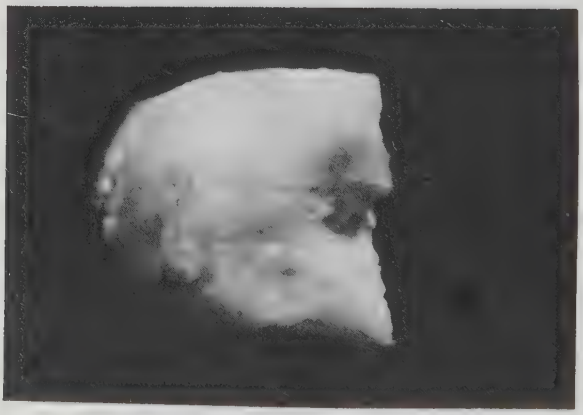


Abb. 3 - 5 : Stapes-Fußplatten mit massiv-otosklerotischen Proliferationen

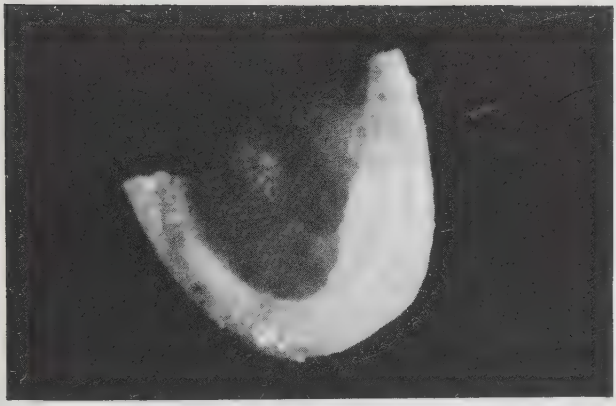
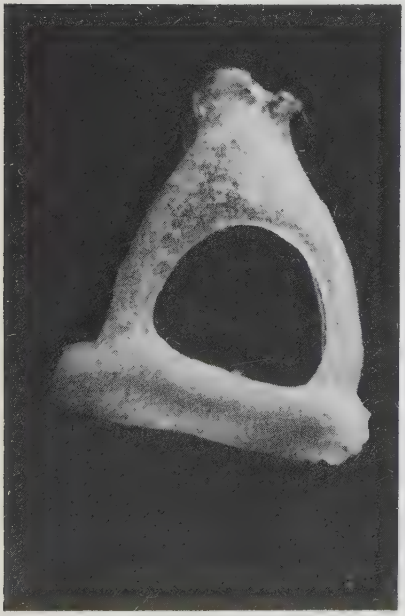


Abb. 6 : Stapes-Fußplatte mit kleinem Herd am Fußplattenrand



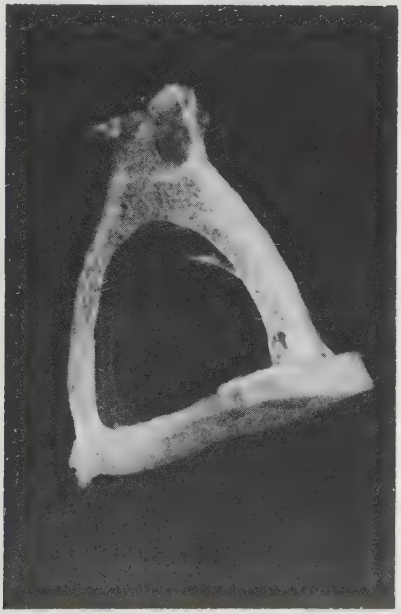


Abb. 7 + 8 : Vollständige Stapes, otosklerosefrei

Wieder aufgetaut erfolgte eine erste Inspektion unter einer Stereolupe bzw. einem Wasserimmersionsmikroskop bei 25-facher Vergrösserung. Dabei wurden für eine Einordnung in die Gruppen a) otosklerotisch, b) fraglich, c) otosklerosefrei als Kriterien herangezogen: Formveränderungen, Verdickungen, oberflächliche Rauhigkeiten, Porositäten und Trübungen (letzeres besonders gut im Wasserimmersionsmikroskop erkennbar). Diese Befunde wurden protokollarisch erfaßt.

Im Anschluß daran erfolgte unter einer Stereolupe die Säuberung der Ossikula von Blut, äusserlichen Verunreinigungen, Weichgewebsresten und Bindegewebsfasern des Ringbandes. Dafür erwiesen sich feine Pinzetten und speziell angefertigte scharfe Kratzinstrumente als zweckmäßig. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Proben wiederum tiefgekühlt in verschlossenen Polyaethylenröhrchen.

Wegen der spezifischen Oberflächenstruktur ließ sich eine vollständige "Enthäutung" nicht immer erreichen. Auch bestand die Gefahr, durch eventuelle präparative Artefakte bei der hohen Empfindlichkeit des Gerätes den Aussagewert der Ergebnisse zu schmälern. Um dies auszuschalten galt es, vor der endgültigen Analyse die Knochen zu zerbrechen, damit an den Bruchflächen unberührte Knochensubstanz der Untersuchung zugänglich gemacht werden konnte. Als nützliche Instrumente dienten wiederum Pinzetten und spitze Brechkeile. Gleichzeitig mit dem zuletzt genannten Arbeitsgang wurden das Protokoll vervollständigt, als weiteres Kriterium die Brechbarkeit vermerkt und Zeichnungen der Knochenbruchstücke mit Kennzeichnung der Bruchflächen hinzugefügt.

Die Einstellung der Bruchflächen in horizontaler Ebene gelang durch Fixierung der Präparate auf mit einem Tropfen Diaethylaether angelösten Polystyrolplättchen. Bis zum Abschuß unter der LASER - Mikrosonde wurden die Proben staubfrei aufbewahrt.

Unter dem Gerätemikroskop konnte die jeweils zu untersuchende Stelle des Steigbügels ausgewählt und exakt eingestellt werden. Bei einer Initialenergie des LASER von 0,75 Joule (energy level 3), der Blende 2 (4,5 mm Durchmesser) und einer Sekundärspannung von 2,2 kV (secondary source 11) erfolgte die Entladung. Als Elektroden wurden Graphitstifte gleicher Form und Präparationsweise verwendet, wie sie im Abschnitt Standardermittlung dargestellt sind.

Von jedem Bruchstück wurden mindestens zwei Spektren gewonnen. Das beschossene Areal der Bruchfläche wurde unter Hinzuziehung des Protokolls festgestellt und in diesem vermerkt.

Am Spektrographen begrenzte eine Schwalbenschwanzblende vor dem 50 μ-Spalt die Linienhöhe auf 1 mm, so daß pro Film bis zu 21 Spektren registriert werden konnten. Wegen der kurzen Belichtungszeit mußte eine besonders empfindliche Photoemulsion verwendet werden. Als günstigste erwies sich die des Kodakfilm 103-o, die eine optimale Sensibilität für den Bereich von 2 000 bis 4 800 Ångström aufweist.

Zur Auswertung der Spektren stand ein Mikrophotometer zur Verfügung, welches bei einem kontinuierlichen Filmvorschub von 1,7 mm/Min. die interessierenden Spektrallinien über eine 13-fach vergrößernde Optik

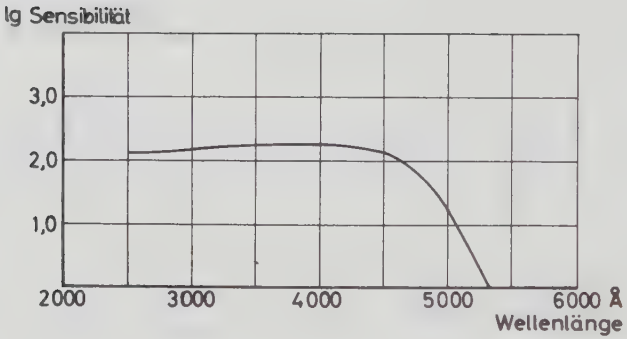


Abb. 9 : Sensibilitätskurve des verwendeten KODAK-Filmes 103-o (nach KODAK)

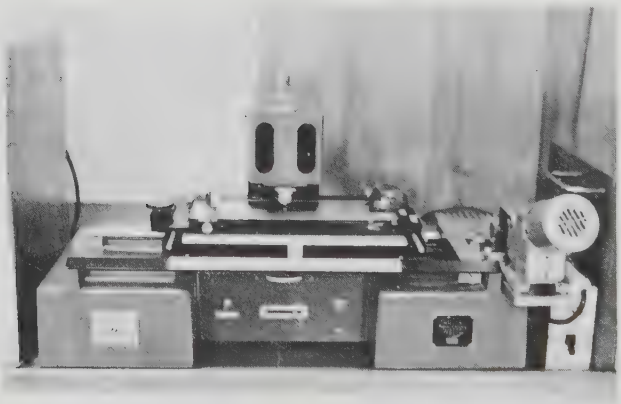


Abb. 10 : Das Mikrophotometer

an einem Spalt von 9 mm Höhe und 0,2 mm Breite vor einer Photozelle passieren ließ.

In folgender Tabelle sind die Elemente mit ihren bei dargestellter Versuchsanordnung als am günstigsten ausmeßbar befundenen Wellenlängen aufgeführt (in Å):

Ca 4454,78	Fe 2585,88	Si 2881,58
P 2535,65	Mn 2576,10	Ag 3280,68
Mg 2802,69	Al 3092,71	Be 3130,42/3131,07

Weitere Elemente konnten mit dieser Methode nicht untersucht werden. Einwertige Kationen wie Na^+ und K^+ vermochten eine Filmschwärzung nicht hervorzurufen, andere Elemente konnten entweder nur selten und schwach (Sn, Ti) beobachtet, mit großer Wahrscheinlichkeit als artifizielle Verunreinigungen (Cu, Zn) identifiziert oder gar nicht registriert werden.

Bei stets gleichbleibender Grobempfindlichkeit (course sensitivity 4; Schreiberempfindlichkeit 5 mA) und Nulleinstellung stellten sich die Linien auf dem Schreiberpapier als Peaks (s.Abb. 11, S. 22) dar, von denen die Werte a, b und c nach der Formel

$$E = \lg \sqrt{\frac{(1 - \frac{a}{d})(1 - \frac{b}{d})}{(1 - \frac{c}{d})^2}}$$

(d = maximaler Schreiberausschlag = 988 Einh.)

mit der Extinktion ein objektives, der Linienschwärzung proportionales Maß ergaben.

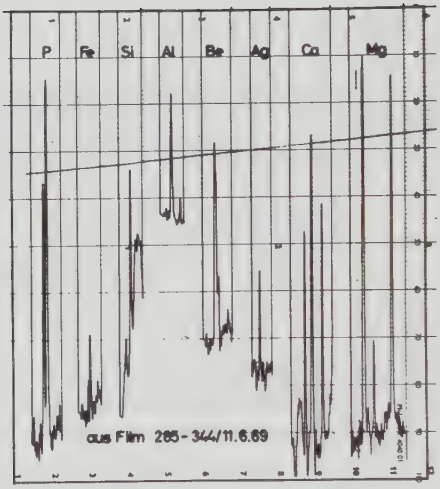


Abb. 11 : Darstellung der Spektrallinien auf dem Schreiberpapier

Die Korrelation der errechneten Extinktionswerte zu absoluten Gewichtsangaben gelingt über Eichkurven mit Hilfe einer elektronischen Datenverarbeitungsanlage im Rechenzentrum des Mathematischen Institutes der Universität Würzburg.

C. Standardermittlung

(10 , 14)

Als entscheidende Schwierigkeit erwies es sich, eine gültige Korrelation zwischen Linienschwärzung und Menge des zur Entladung gekommenen Elementes zu finden.

In oben beschriebener Anordnung ist die Intensität des Emissionsspektrums abhängig von der Intensität der Sekundärentladung, diese wiederum eine Funktion der Dichte der Dampfwolke. Hier stellten sich allerdings die größten Inkontinuitäten ein. Presslinge, Polymerisate und Gele mit bekannten Konzentrationen der verschiedenen Elemente wurden hergestellt, um nach Ausmessung der Einschußtrichter Eichkurven aufstellen zu können. All diese Versuche schlugen fehl, weil durch Splitterwirkung einerseits und Schmelzprozesse andererseits nur immer ein nicht näher bestimmbarer Teil des Trichtervolumens in angeregtem Zustand vorliegt und als solcher zur Entladung kommen konnte. Die für die Sonde sonst übliche Probenanordnung mußte aus diesem Grunde abgewandelt werden.

Eine definierte Menge einer Standardprobe konnte nur so in die Funkenstrecke gebracht werden, indem sie als wässerige Lösung direkt auf eine der Elektroden aufgetragen wurde. Damit aber die pipettierte Substanz vollständig verdampfen konnte, mußte folgende Bedingung erfüllt werden: Der Funke hatte eng begrenzt an dem Ort überzuspringen, der gleichzeitig Auftragspunkt des Standards sein konnte.

Keine der handelsüblichen Elektrodenformen konnte dieser Forderung gerecht werden, so daß industriell

vorgefertigte, spitze Graphitstifte in der Art abgedreht werden mußten, wie sie Abb.12 darstellt.

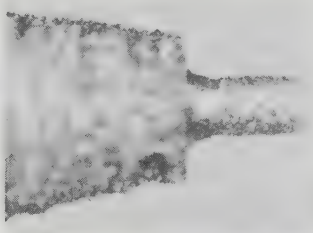


Abb. 12

Als Schneidewerkzeuge dienten Quarzglassplitter, die eine Mineralverunreinigung weitgehend vermeiden halfen. Dennoch wurden die Elektroden anschliessend je zweimal einer reinigenden Leerentladung ausgesetzt.

Als weitere Bedingung mußte die Lösung auf der Nippeloberfläche eine möglichst homogene Verteilung erfahren. Diese wurde erreicht, indem die Elektrodenspitzen, ca. 3 mm in eine 0,01 -molare Triaethylamin-HCl-Lösung getaucht, für 18 Minuten bei 9 Volt Spannung einer anodischen Oxydation unterworfen wurden.

Nach der Elektrolyse erfolgten eine zweifache Waschung der Elektroden in aqua bidest. unter Spannungsschutz, danach eine nochmalige Spülung unter fließendem aqua bidest. Mit Hilfe von Methanol- und Diaethylaether-Bädern getrocknet wurden sie bis zum Auftragen der Standards staubfrei gelagert.

Die Eichlösungen wurden mit von außen unbenetzbar gemachten Glaskapillaren von 36,675 nl Fassungsvermögen

pipettiert. Um den Auftragsort weitgehend auf die Hälfte des Nippels zu begrenzen, mussten die Volumina als Einzeltropfen jeweils nach Verdampfen des vorherigen in 4 bis 6 Fraktionen aufgetragen werden. Zur Kontrolle dieses Vorganges eignete sich eine Lupe mit 16-facher Vergrösserung.

Die Anordnung der Elektroden in ihrer Halterung war durch ihre Spezialform gegenüber der von der Firma vorgeschlagenen Art insofern abzuändern, als sie sich jetzt in einem Spitzenabstand von ca. 1,5 mm achsengerecht gegenüberstehen mußten, um jeglichen Funkenschatten zu vermeiden.
Gezündet wurde der Funke unter Beschuß einer Leerprobe aus Polystyrol, das keinerlei mineralische Bestandteile enthielt.

Aus den Extinktionen der ausgewerteten beständigen Emissionslinien und den Gewichten der Elemente aus den aufgetragenen Standardverdünnungen ergaben sich die im folgenden dargestellten Eichkurven:

$$E_{Ag} = 0{,}00384 \cdot c^3 - 0{,}27588 \cdot c^2 + 7{,}23668 \cdot c + 7{,}19542$$

$$E_{Al} = 163{,}49700 \cdot c^3 - 75{,}74353 \cdot c^2 + 13{,}55651 \cdot c + 0{,}50267$$

$$E_{Be} = 0{,}12425 \cdot c^3 - 1{,}66907 \cdot c^2 + 7{,}15164 \cdot c + 1{,}32373$$

$$E_{Ca} = 7{,}72488 \cdot c^3 - 19{,}11048 \cdot c^2 + 17{,}99672 \cdot c + 1{,}42745$$

$$E_{Fe} = 55{,}53744 \cdot c^3 - 60{,}88772 \cdot c^2 + 27{,}98123 \cdot c + 0{,}40694$$

$$E_{Mg} = 19{,}35140 \cdot c^3 - 41{,}72630 \cdot c^2 + 31{,}41219 \cdot c + 3{,}38999$$

$$E_{Mn} = 0{,}03226 \cdot c^3 - 0{,}50525 \cdot c^2 + 3{,}07374 \cdot c + 0{,}98991$$

$$E_{P} = 21{,}12846 \cdot c^3 - 39{,}60895 \cdot c^2 + 28{,}43252 \cdot c + 0{,}25157$$

$$E_{Si} = 9{,}89174 \cdot c^3 - 20{,}11663 \cdot c^2 + 13{,}88749 \cdot c + 1{,}29179$$

Um den Kurvenverlauf zu veranschaulichen, sind im Diagramm (Abb.13) die Meßwerte und die Ausgleichsparabel von Phosphor dargestellt. Analog hierzu, unter Berücksichtigung der spezifischen Parameter, weisen die Eichkurven der übrigen Elemente die gleichen Charakteristika auf.

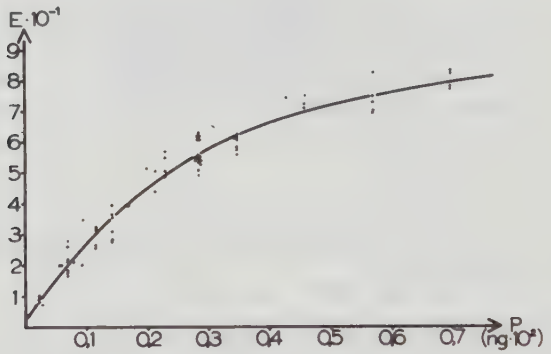


Abb. 13 : Eichkurve für Phosphor

In Tab.1a sind die Koordinatenwerte der Meßpunkte für Phosphor aufgeführt. Aus programmtechnischen Gründen mußte bei diesen jedoch eine Maßstabveränderung vorgenommen werden. Bezüglich Phosphor beträgt diese für die Abszissenwerte (nanogramm P) 10^{-2}, für die Ordinatenwerte (Extinktion) 10^{+1}. Die entsprechenden Faktoren der anderen Elemente zeigt Tab. 1b.

Diese formulierten Ausgleichskurven bilden die Basis für die Errechnung der gefundenen Meßdaten aus den Knochenspektren, so daß für die statistische Auswertung nurmehr Gewichtsangaben der betreffenden Elemente zur Verfügung stehen.

ngP	E	ngP	E	ngP	E
2,333	0,080	14,265	0,360	28,531	0,615
2,333	0,085	14,265	0,395	28,531	0,630
2,333	0,100	14,265	0,480	34,844	0,555
2,853	0,070	17,118	0,390	34,844	0,570
5,706	0,205	19,971	0,515	34,844	0,580
5,706	0,205	21,398	0,440	34,844	0,605
6,998	0,165	21,398	0,505	34,844	0,615
6,998	0,205	22,949	0,490	34,844	0,620
6,998	0,220	22,949	0,505	34,844	0,625
6,998	0,260	22,949	0,550	42,796	0,735
7,133	0,175	22,949	0,570	42,796	0,740
7,133	0,175	28,531	0,485	45,898	0,715
7,133	0,280	28,531	0,505	45,898	0,720
8,152	0,210	28,531	0,505	45,898	0,750
9,415	0,200	28,531	0,535	57,061	0,685
9,415	0,345	28,531	0,540	57,061	0,700
11.664	0,245	28,531	0,545	57,061	0,725
11,664	0,265	28,531	0,545	57,061	0,745
11,664	0,315	28,531	0,550	57,061	0,825
11,664	0,320	28,531	0,550	69,688	0,770
14,265	0,270	28,531	0,560	69,688	0,770
14,265	0,280	28,531	0,610	69,688	0,830
14,265	0,310	28,531	0,610	69,688	0,835
14,265	0,350	28,531	0,610		

n = 71

Tab. 1a: Wertetabelle für die Phosphor-Eichkurve

(aufgeführt sind die Koordinaten der Meßwerte, die über die Errechnung eines Polynoms 3. Grades zu den Parametern der Eichkurve führten)

	Ag	Al	Be	Ca	Fe	Mg	Mn	P	Si
E :	10^{+2}	10^{+1}	10^{+1}	10^{+1}	10^{+1}	10^{+1}	10^{+1}	10^{+1}	10^{+1}
c (ng) :	10^{+1}	1	10^{+2}	10^{-2}	1	10^{-1}	10^{+1}	10^{-2}	1

Tab. 1b: Faktoren zur Maßstabveränderung der Meßwerte für die elektronische Datenverarbeitung

(analog hierzu mußten die Ergebnisse zurückgerechnet werden)

D. Untersuchungsergebnisse

Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse sind nach den neun untersuchten Elementen geordnet. Für jedes Element ist unterteilt worden in die Klassen

A. Stapesfußplatte und

B. Stapesschenkel, bzw. -kopf.

Diese Klassen sind wiederum in drei Gruppen gegliedert:

Kein Otosklerosеherd,

Fraglicher Otosklerosеherd und

Sicherer Otosklerosеherd.

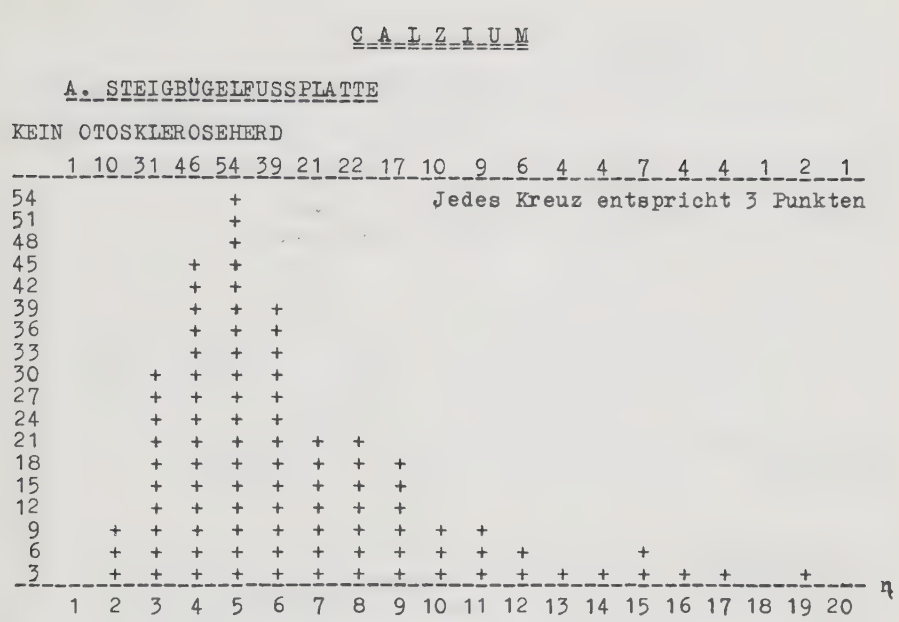
Für jede dieser Gruppen ist eine Verteilungskurve mit Angaben über deren Klassengrenzen (η = 1 bis 20; in ng), Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s; beide in ng), sowie die Anzahl der Proben (n pro Klasse und n total) aufgeführt.

Für jede Klasse werden zudem innerhalb eines kurzen Kommentars noch anhand einer Tabelle die Verhältnisse von Standardabweichung zu Mittelwert, die Verteilung und die wahrscheinlichsten Werte gegenübergestellt.

C A L Z I U M

A. STEIGBÜGELFUSSPLATTE

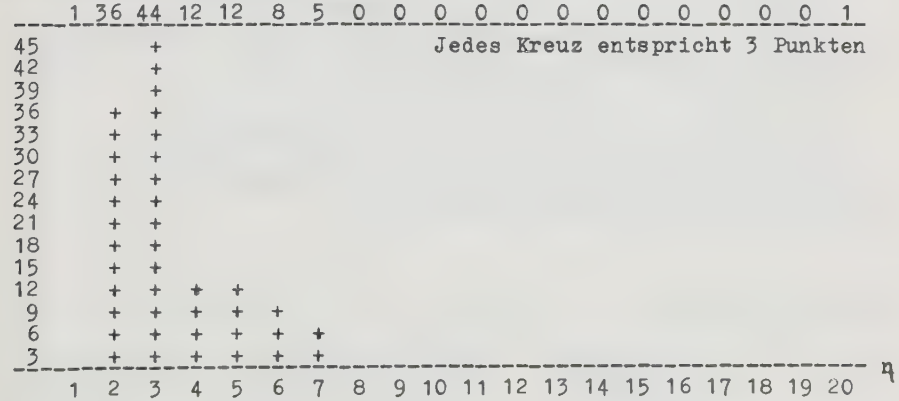
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 8(η - 1) + 2,410 (in ng)

Mittelwert : 44,0 ± 29,6 ng n = 293

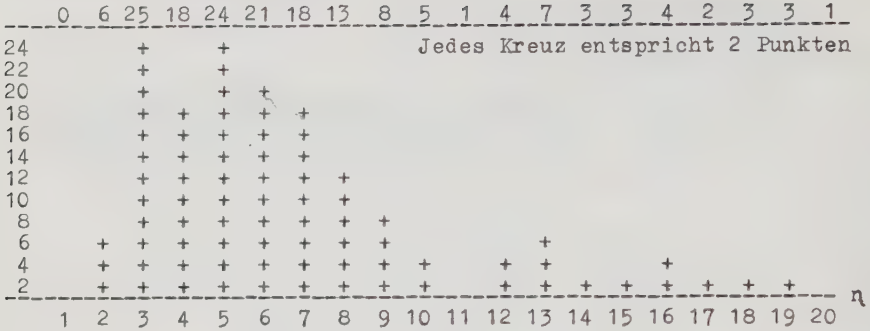
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 23,8(η - 1) + 3,3 (in ng)

Mittelwert : 51,8 ± 48,0 ng n = 119

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = $7{,}73(n - 1) + 1{,}83$ (in ng)

Mittelwert : $46{,}2 \pm 33{,}4$ ng n = 169

Kommentar

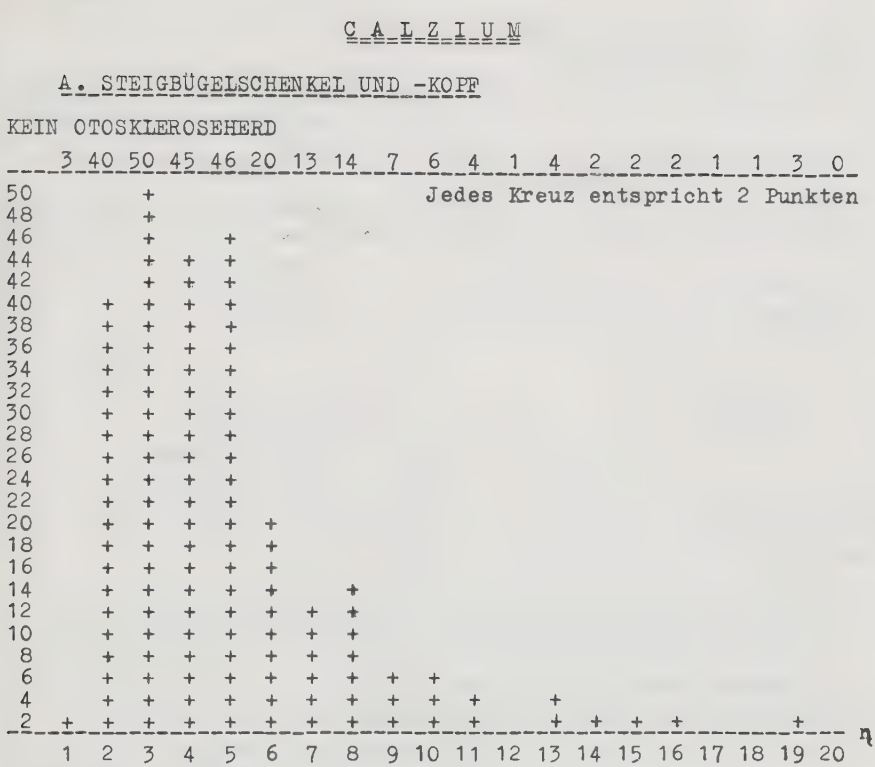
	Otosklerosеherd kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,67	0,93	0,72
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	30,4	39,0	28,9

Die Mittelwerte der durch die LASER-Sonde herausgeschossenen Calzium-Mengen gleichen sich an.
Die Proben mit fraglichem Herd zeigen den höchsten Mittelwert, womit angenommen werden kann, daß in einer Zwischen oder Umbau-Phase eine verstärkte Calzium-Einlagerung und eine Gefügelockerung mit noch unbekanntem Gewicht auftreten.

C A L Z I U M

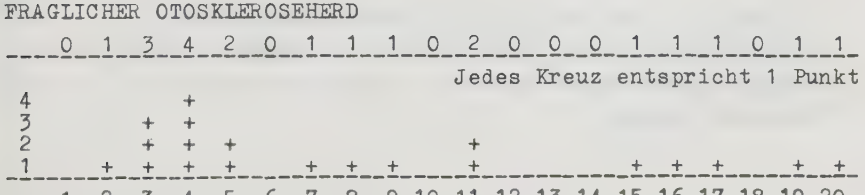
A. STEIGBÜGELSCHENKEL UND -KOPF

KEIN OTOSKLEROSEHERD



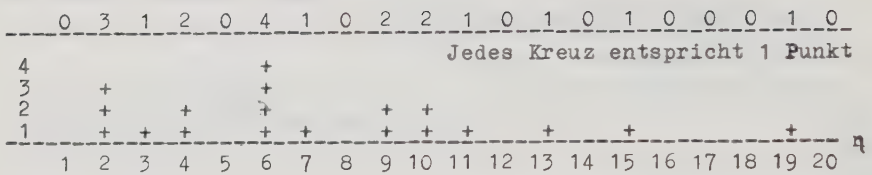
Klassengrenzen = 8,05(η - 1) + 0,125 (in ng)
Mittelwert : 29,9 ± 27,5 ng n = 264

FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 7,14(η - 1) + 9,35 (in ng)
Mittelwert : 59,5 ± 42,5 ng n = 20

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = $3{,}80(\eta - 1) + 7{,}35$ (in ng)

Mittelwert : $30{,}1 \pm 18{,}0$ ng n = 19

Kommentar

	Otosklerosеherd kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,92	0,71	0,60
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	12,2	27,2	24,5

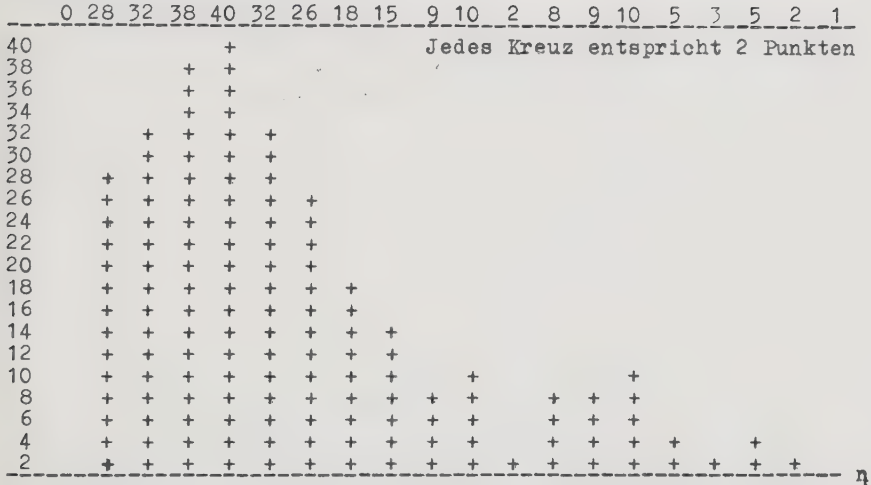
Die Mittelwerte der durch die LASER-Sonde herausgeschossenen Calzium-Mengen von normalem und otosklerotischem Material gleichen sich an.
Die Proben mit fraglichem Herd zeigen den höchsten Mittelwert, womit angenommen werden darf, daß in einer Zwischen- oder Umbau-Phase eine verstärkte Kalk-Einlagerung und eine Gefügelockerung mit noch nicht bekanntem Gewicht auftreten.

Im Vergleich mit den Stapesfußplatten zeigt sich, daß die Areale von Stapesschenkel und -kopf mit Ausnahme bei fraglichem Herd bis zu 32 % weniger Ca enthalten können.

P H O S P H O R

A. STEIGBÜGELFUSSPLATTE

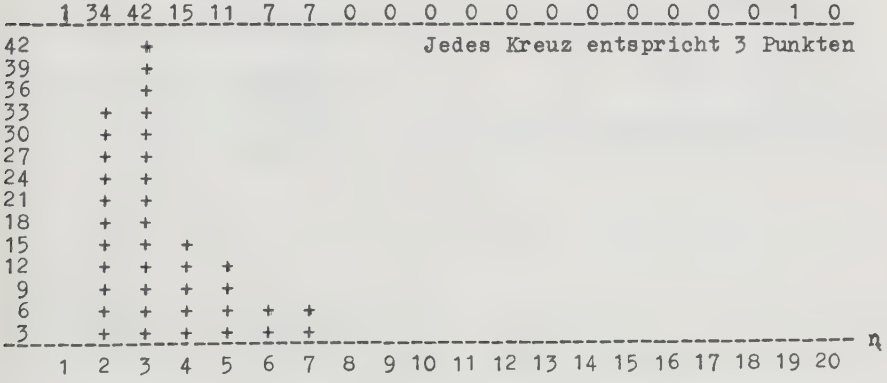
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 5,35(η - 1) + 1,25 (in ng)

Mittelwert : 30,4 ± 22,7 ng n = 293

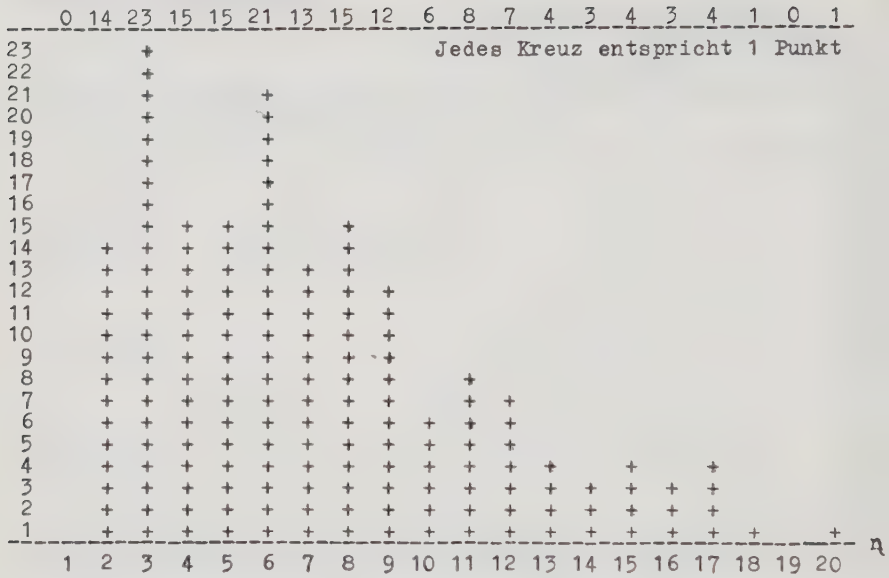
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 16,6(η - 1) + 0,171 (in ng)

Mittelwert : 34,4 ± 34,4 ng n = 118

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = $5{,}71(\eta - 1) + 1{,}25$ (in ng)

Mittelwert : $33{,}7 \pm 23{,}4$ ng n = 169

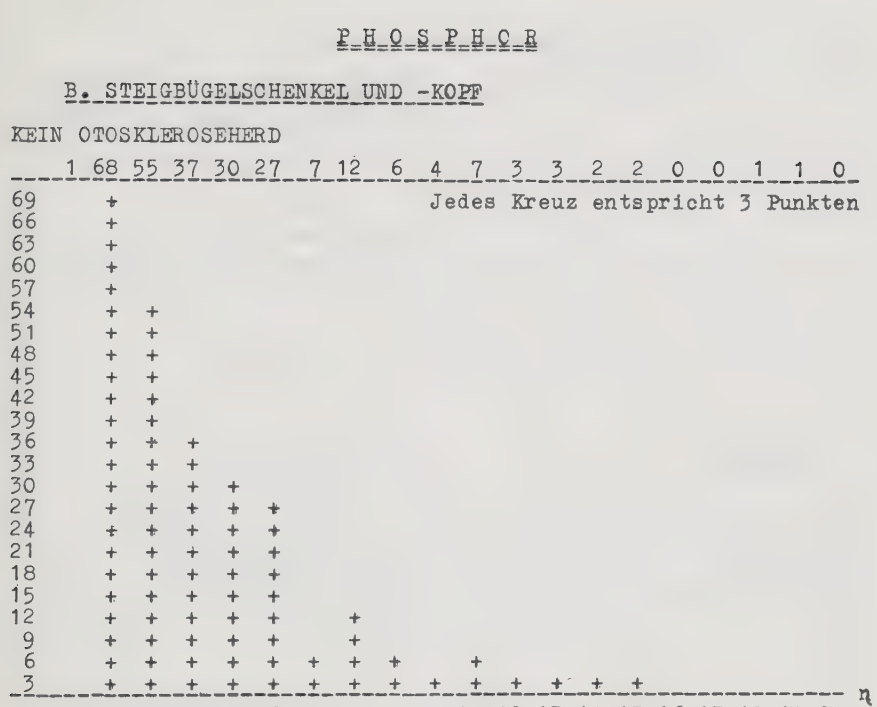
Kommentar

	Otosklerosеherd kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,75	1,00	0,69
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	20,0	25,0	9,82

P H O S P H O R

B. STEIGBÜGELSCHENKEL UND -KOPF

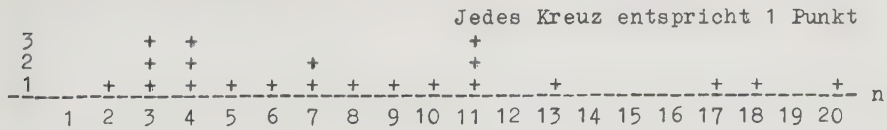
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 6,37(n - 1) + 0,348 (in ng)

Mittelwert : 20,6 ± 19,9 ng n = 266

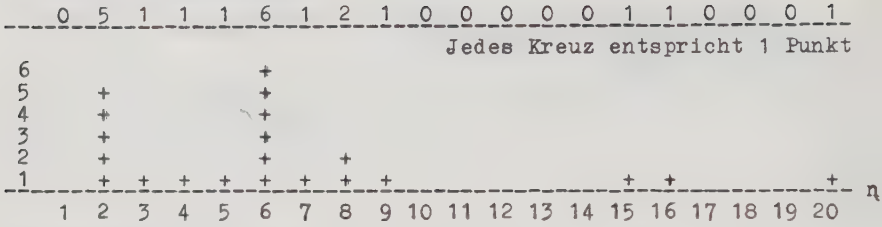
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 3,93(n - 1) + 1,80 (in ng)

Mittelwert : 28,8 ± 20,6 ng n = 21

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = $4{,}27(\eta - 1) + 1{,}07$ (in ng)

Mittelwert : $23{,}1 \pm 20{,}2$ ng n = 21

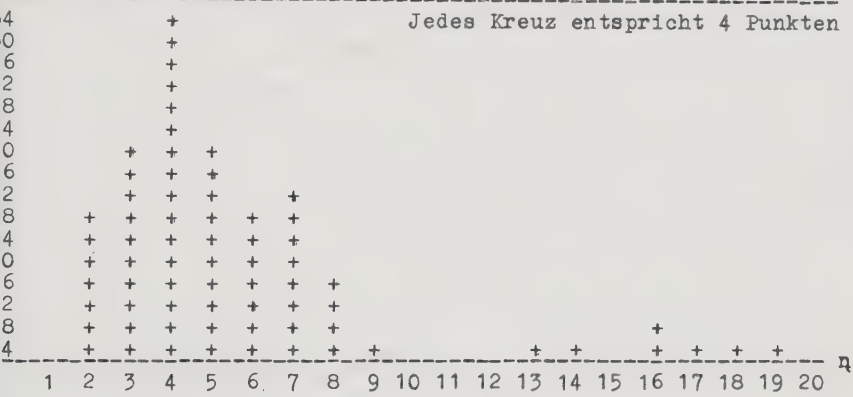
Kommentar

	Otosklerosherd kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,97	0,72	0,87
Verteilung	----linksschräg-------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	3,53	9,66	20,3

M A G N E S I U M

A. STEIGBÜGELFUSSPLATTE

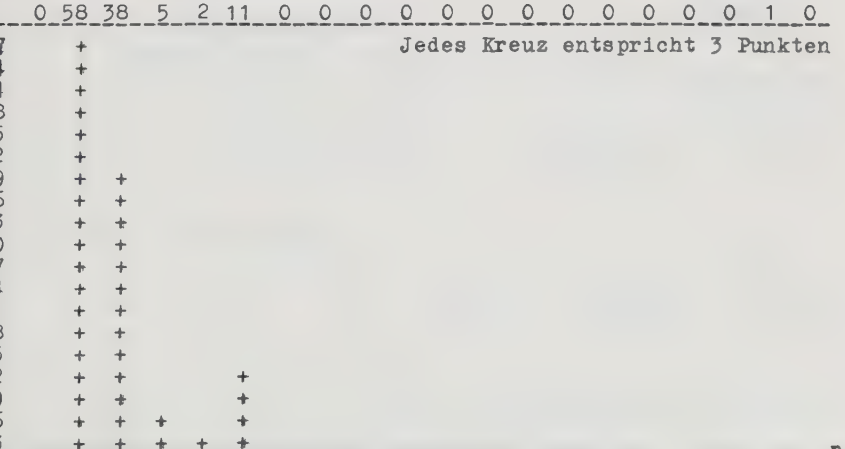
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = $0{,}66(n - 1) + 0{,}003$ (in ng)

Mittelwert : $2{,}88 \pm 2{,}48$ ng n = 287

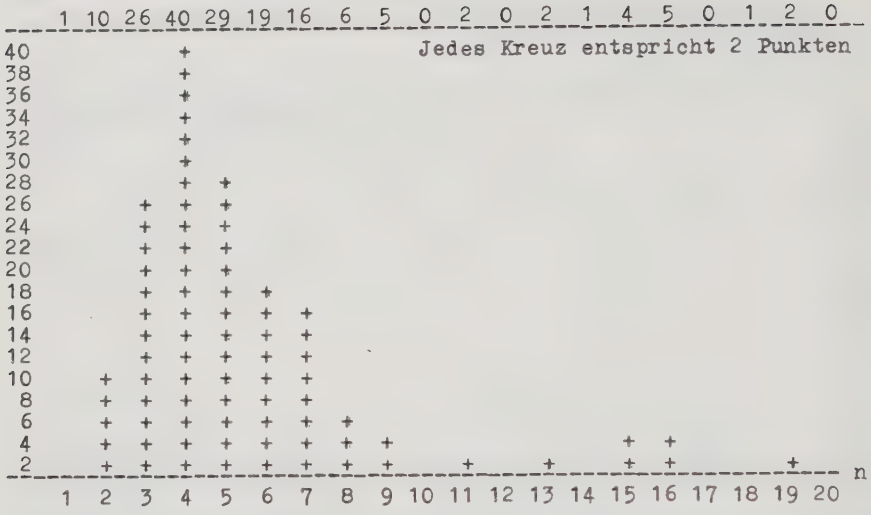
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = $2{,}27(n - 1) + 0{,}10$ (in ng)

Mittelwert : $3{,}54 \pm 4{,}47$ ng n = 115

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,741(n - 1) + 0,0675 (in ng)

Mittelwert : 3,25 ± 2,68 ng n = 169

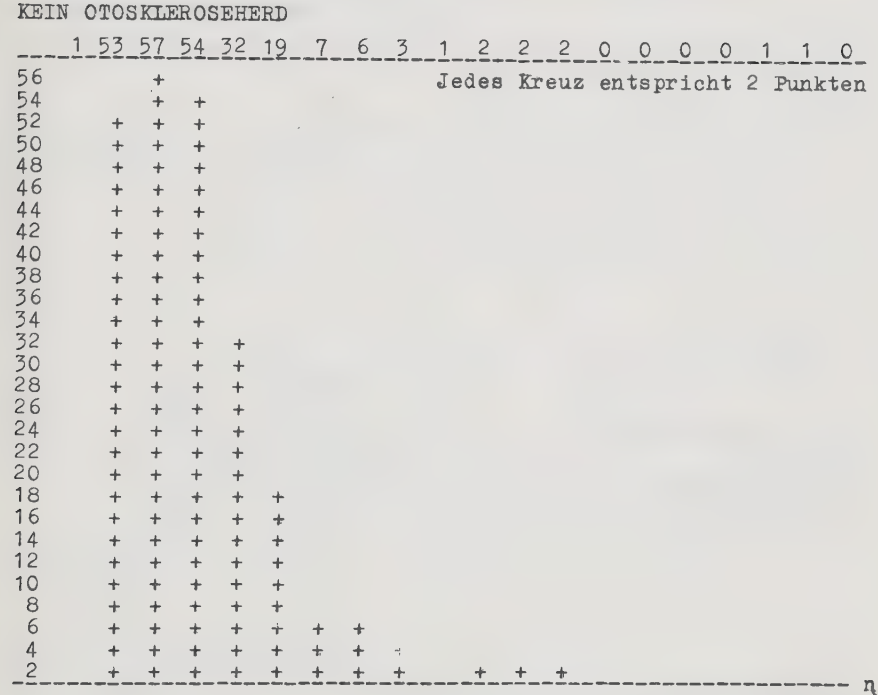
Kommentar

	Otosklerosеherd		
	kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,86	1,26	0,82
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	1,65	1,24	1,92

M A G N E S I U M

B. STEIGBÜGELSCHENKEL UND -KOPF

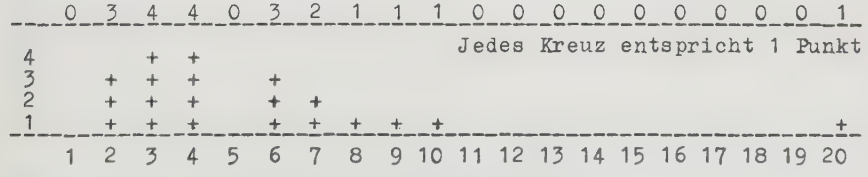
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,768(n - 1) + 0,084 (in ng)

Mittelwert : 2,13 ± 1,90 ng n = 241

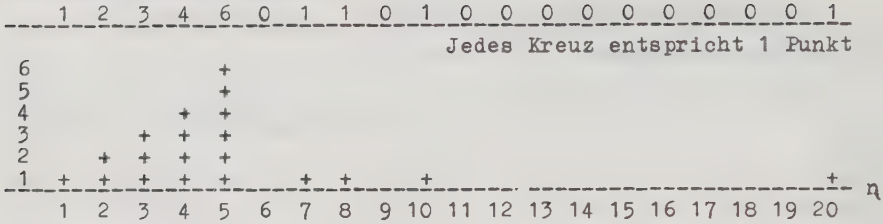
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,406(n - 1) + 0,084 (in ng)

Mittelwert : 2,49 ± 1,67 ng n = 20

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = $0{,}592(\eta - 1) + 0{,}149$ (in ng)

Mittelwert : $2{,}41 \pm 2{,}33$ ng $\quad n = 20$

Kommentar

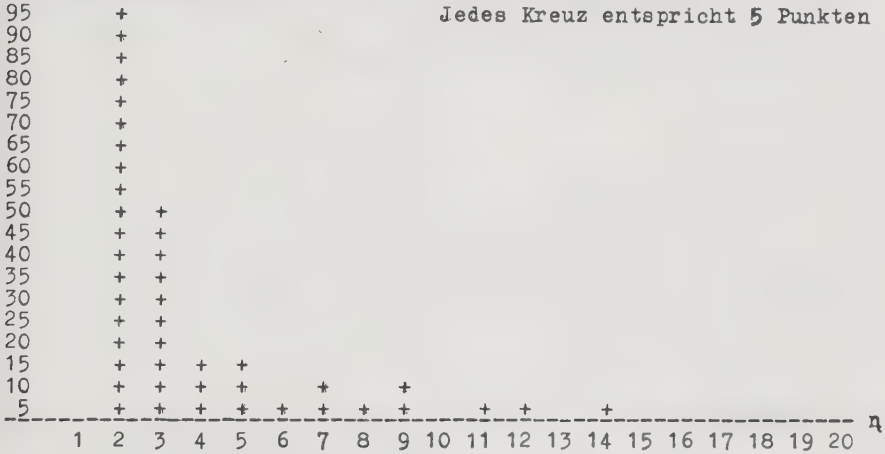
	Otosklerosеherd kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,89	0,67	0,97
Verteilung	-----linksschräg-----		
wahrscheinlichster Wert (ng)	1,24	0,90	2,22

E I S E N

A. STEIGBÜGELFUSSPLATTE

KEIN OTOSKLEROSEHERD

1	96	49	14	13	6	8	5	8	2	3	4	1	3	1	2	0	0	0	1

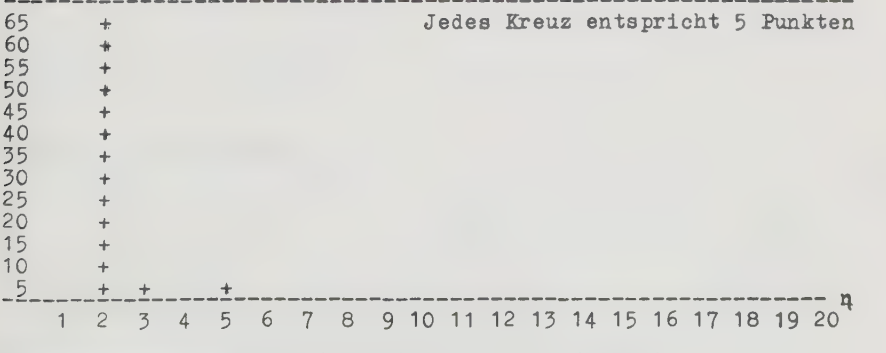


Klassengrenzen = 0,0431(η - 1) + 0,00335 (in ng)

Mittelwert : 0,114 ± 0,143 ng n = 217

FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD

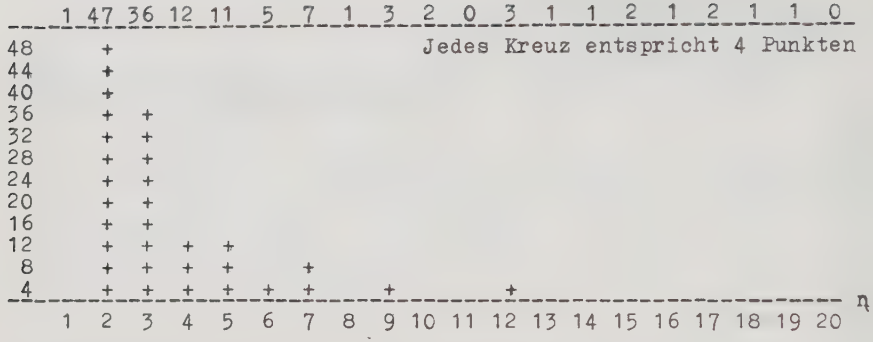
0	66	7	2	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1



Klassengrenzen = 0,1364(η - 1) + 0,00517 (in ng)

Mittelwert : 0,139 ± 0,292 ng n = 82

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0413(η - 1) + 0,00335 (in ng)

Mittelwert : 0,126 ± 0,160 ng n = 137

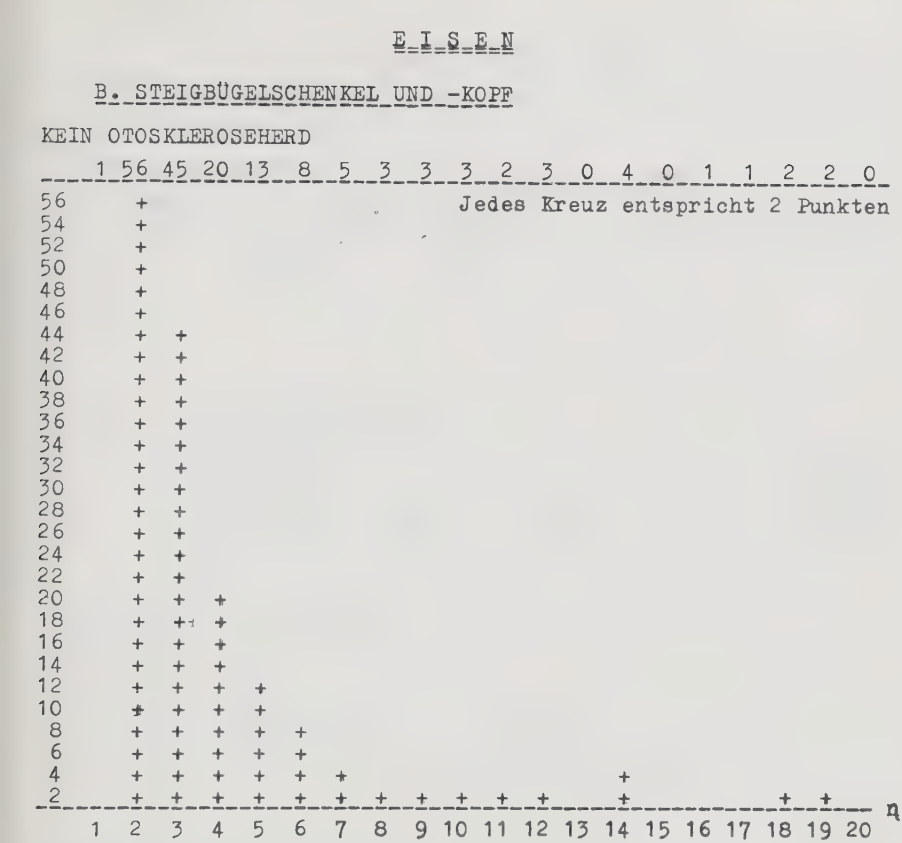
Kommentar

	Otosklerosеherd kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	1,25	2,10	1,27
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	0,025	0,073	0,024

E I S E N

B. STEIGBÜGELSCHENKEL UND -KOPF

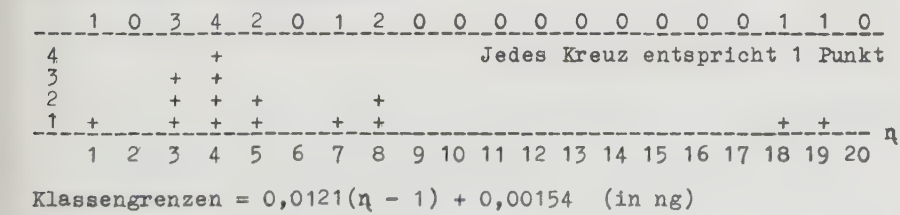
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0322(η - 1) + 0,00154 (in ng)

Mittelwert : 0,098 ± 0,121

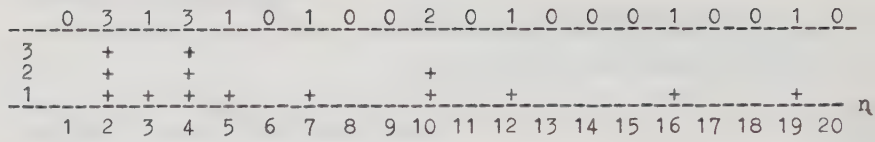
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0121(η - 1) + 0,00154 (in ng)

Mittelwert : 0,061 ± 0,065 n = 15

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,01(n - 1) + 0,0242 (in ng)

Mittelwert : 0,08 ± 0,057 ng n = 14

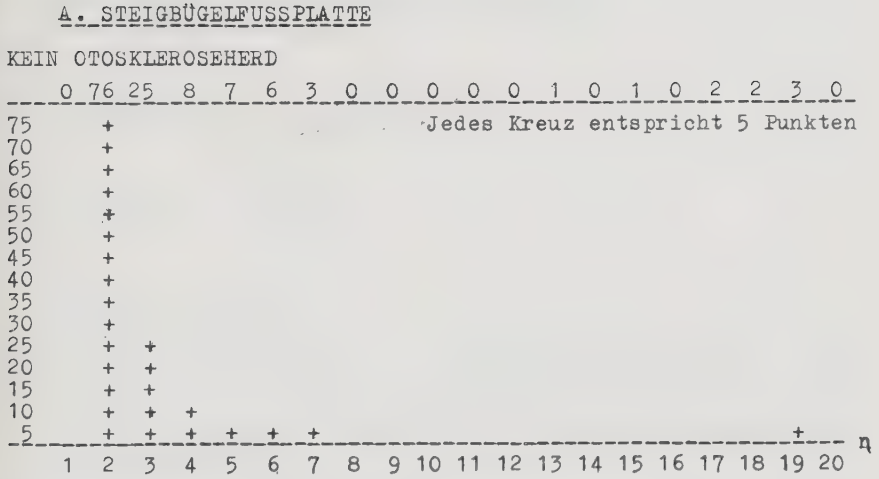
Kommentar

	Otoskleroseherd kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	1,23	1,07	0,71
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	0,018	0,032	--

S I L I Z I U M

A. STEIGBÜGELFUSSPLATTE

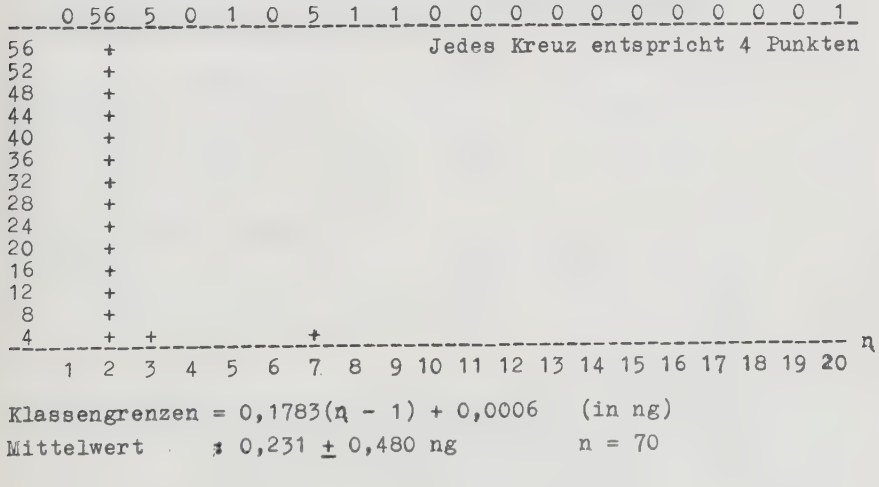
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0705(η - 1) + 0,0006 (in ng)

Mittelwert : 0,152 ± 0,277 ng n = 134

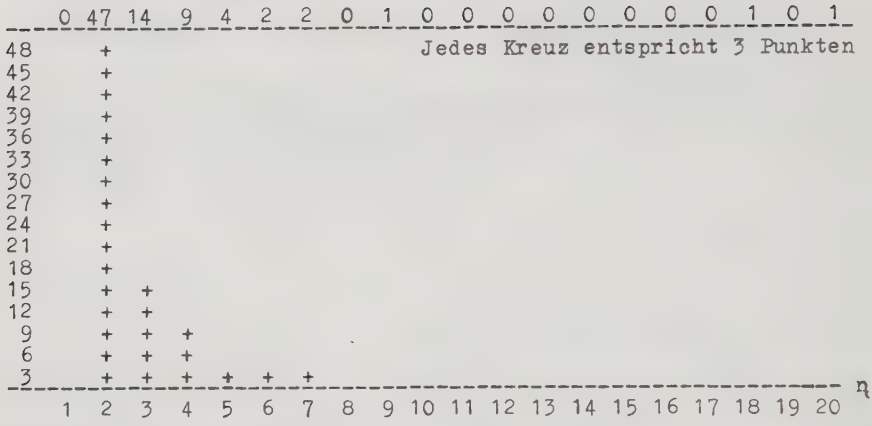
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,1783(η - 1) + 0,0006 (in ng)

Mittelwert : 0,231 ± 0,480 ng n = 70

SICHERER OTOSKLEROSEHERD

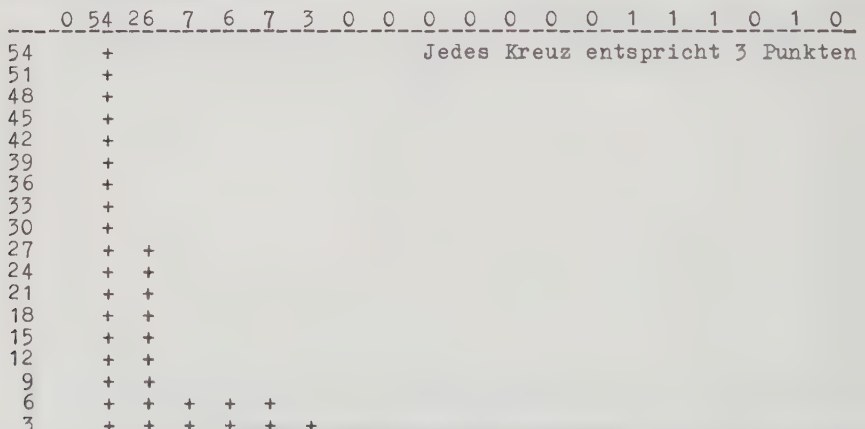


Klassengrenzen = 0,0666(η - 1) + 0,0006 (in ng)

Mittelwert : 0,115 ± 0,193 ng n = 81

B. STEIGBÜGELSCHENKEL UND -KOPF

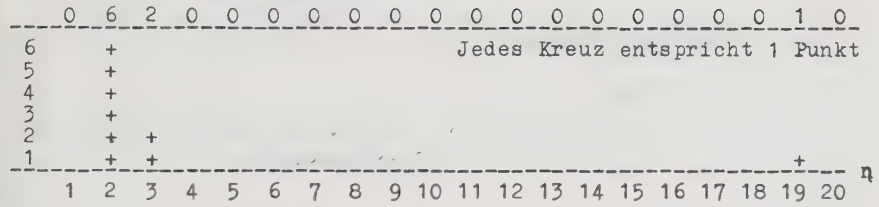
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0705(η - 1) + 0,0006 (in ng)

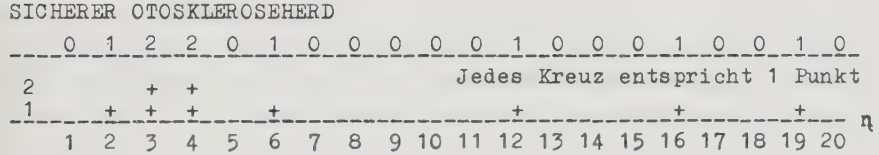
Mittelwert : 0,136 ± 0,213 ng n = 107

FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0545(η - 1) + 0,0006 (in ng)
Mittelwert : 0,147 ± 0,314 ng n = 9

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0148(η - 1) + 0,0191 (in ng)
Mittelwert : 0,112 ± 0,098 ng n = 9

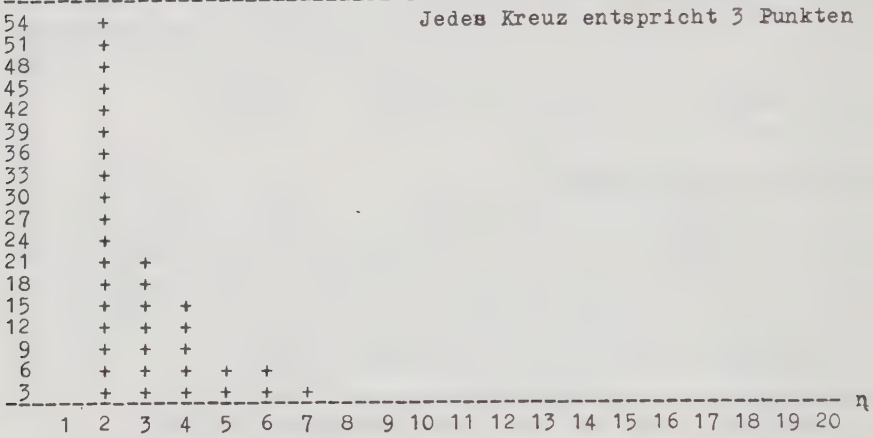
Kommentar

	Otosklerosеherd kein	fragl.	sicher
A. Steigbügelfußplatte			
Standardabweichung zu $\bar{x}$	1,82	2,08	1,68
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	0,036	--	0,01
B. Steigbügelschenkel und -kopf			
Standardabweichung zu $\bar{x}$	1,57	2,14	0,88
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	0,036	0,028	0,056

B E R Y L L I U M

A. STEIGBÜGELFUSSPLATTE

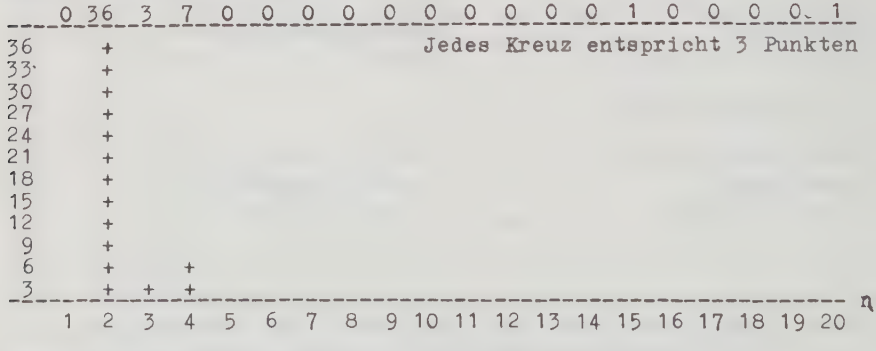
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0036(η - 1) + 0,000037 (in ng)

Mittelwert : 0,00566 ± 0,00779 ng n = 103

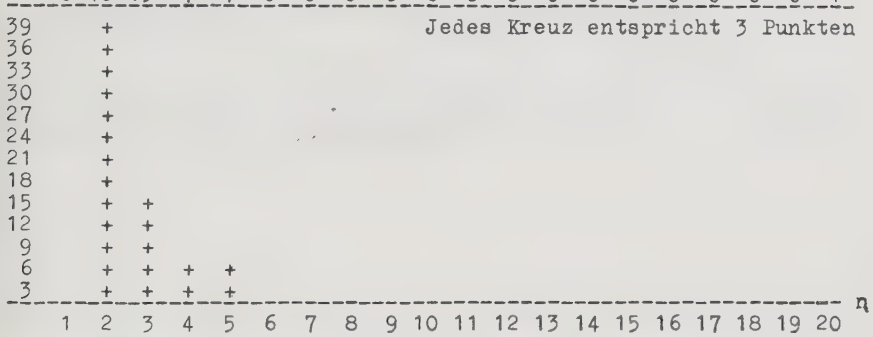
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,00518(η - 1) + 0,000107 (in ng)

Mittelwert : 0,0073 ± 0,01623 ng n = 48

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = $0{,}00436(n - 1) + 0{,}000037$ (in ng)

Mittelwert : $0{,}00589 \pm 0{,}01$ ng n = 70

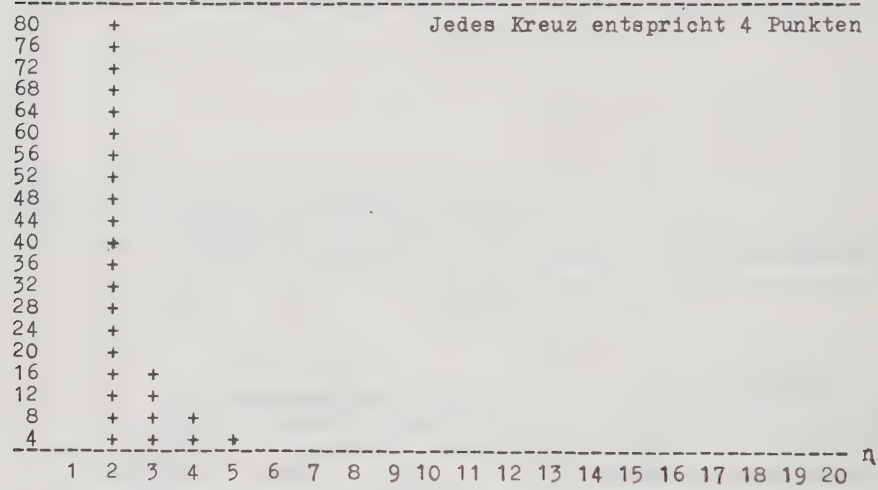
Kommentar

	Otosklerosеherd kein	fragl.	sicher
A. Steigbügelfußplatte			
Standardabweichung zu $\bar{x}$	1,38	2,22	1,70
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (pg)	3,64	2,70	2,22
B. Steigbügelschenkel und -kopf			
Standardabweichung zu $\bar{x}$	2,13	0,90	1,43
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (pg)	2,43	19,7	2,63

B E R Y L L I U M

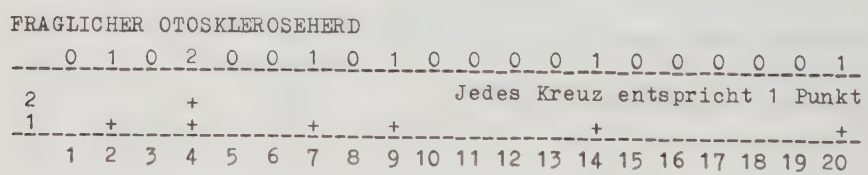
B. STEIGBÜGELSCHENKEL UND -KOPF

KEIN OTOSKLEROSEHERD



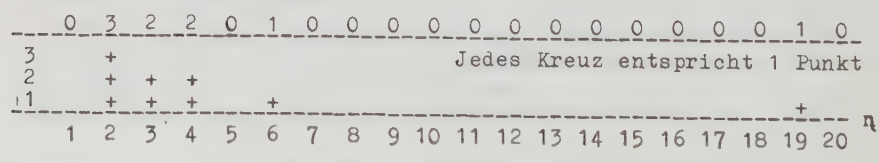
Klassengrenzen = 0,00497(η - 1) + 0,000037 (in ng)
Mittelwert : 0,008 ± 0,017 ng n = 114

FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,00777(η - 1) + 0,00032 (in ng)
Mittelwert : 0,00555 ± 0,00498 ng n = 7

SICHERER OTOSKLEROSEHERD

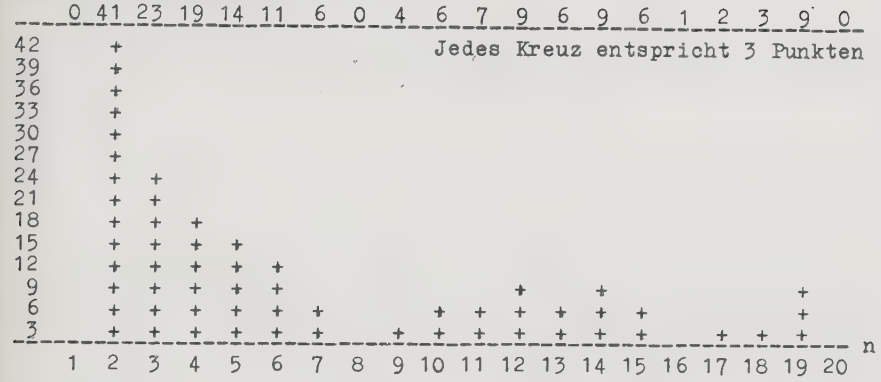


Klassengrenzen = 0,001085(η - 1) + 0,00046 (in ng)
Mittelwert : 0,00425 ± 0,00609 ng n = 9

A L U M I N I U M

A. STEIGBÜGELFUSSPLATTE

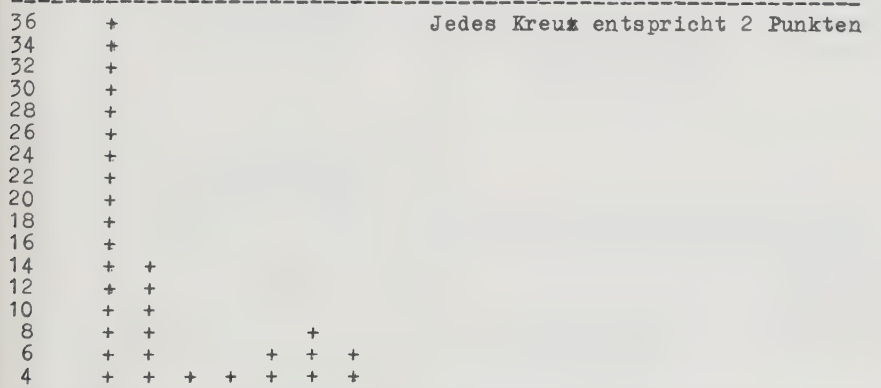
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0219(n - 1) + 0,00356 (in ng)

Mittelwert : 0,126 ± 0,117

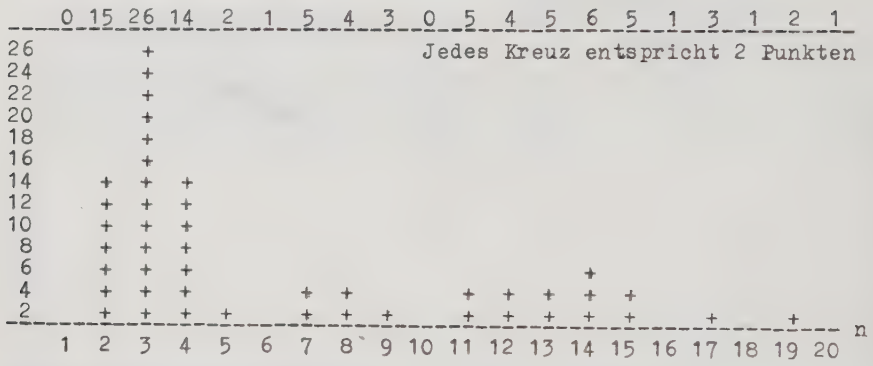
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,05025(n - 1) + 0,0116 (in ng)

Mittelwert : 0,157 ± 0,154 ng n = 89

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0229(n - 1) + 0,0253 (in ng)

Mittelwert : 0,132 ± 0,123 n = 103

Kommentar

	Otosklerosehерd kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,93	0,98	0,93
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	0,014	0,037	0,060

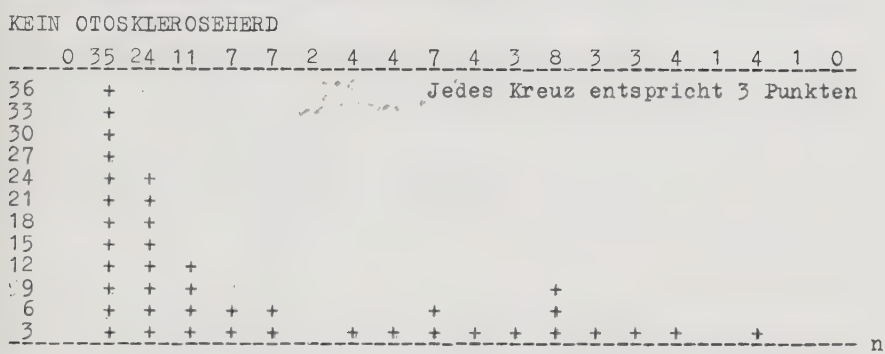
Kommentar (zu S. 53)

	Otosklerosehерd kein	fragl.	sicher
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,98	--	1,04
Verteilung	-----linksschräg------		
wahrscheinlichster Wert (ng)	0,011	--	0,02

ALUMINIUM

B. STEIGBÜGELSCHENKEL UND -KOPF

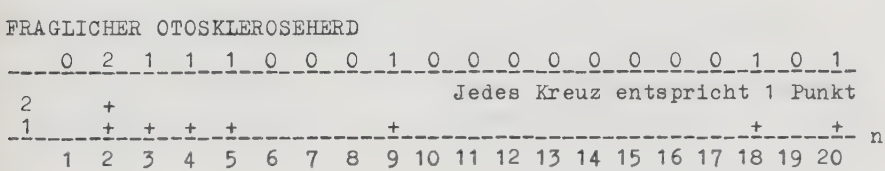
KEIN OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0145 (n - 1) + 0,00356 (in ng)

Mittelwert : 0,126 ± 0,124 n = 132

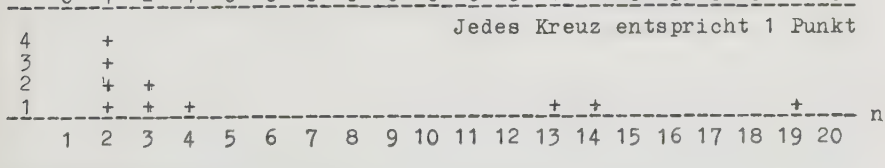
FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0197(n - 1) + 0,0116 (in ng)

Mittelwert : 0,134 ± 0,140 n = 8

SICHERER OTOSKLEROSEHERD



Klassengrenzen = 0,0175(n - 1) + 0,0116 (in ng)

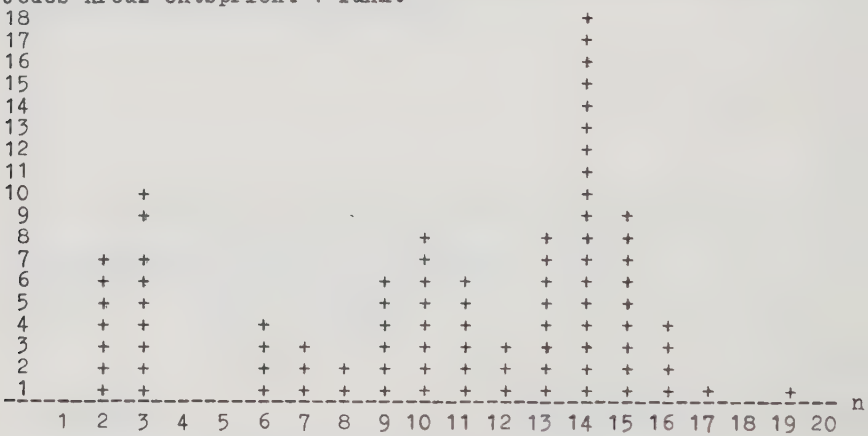
Mittelwert : 0,097 ± 0,118 n = 10

S I L B E R

A. STEIGBÜGELFUSSPLATTE

KEIN OTOSKLEROSEHERD

0	7	10	0	0	4	3	2	6	8	6	3	8	18	9	4	1	0	1	0

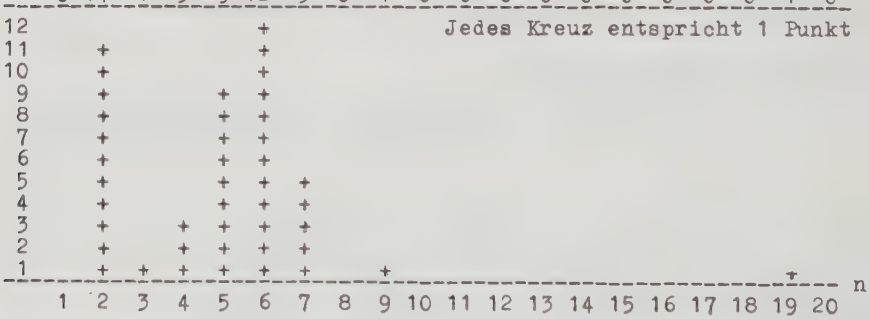


Klassengrenzen = 0,407(n - 1) + 0,684 (in ng)

Mittelwert : 4,279 ± 1,887 ng n = 90

FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD

0	11	1	3	9	12	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0



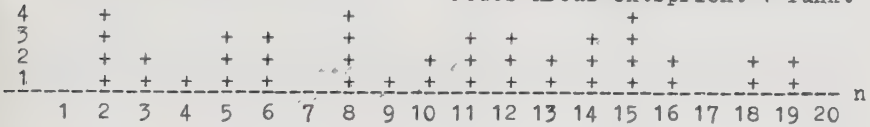
Klassengrenzen = 0,99(n - 1) + 0,817 (in ng)

Mittelwert : 4,3305 ± 2,933 ng n = 43

SICHERER OTOSKLEROSEHERD

0 4 2 1 3 3 0 4 1 2 3 3 2 3 4 2 0 2 2 0

Jedes Kreuz entspricht 1 Punkt



Klassengrenzen = 0,422(n - 1) + 0,460 (in ng)

Mittelwert : 4,0676 ± 2,1971 ng n = 41

Kommentar

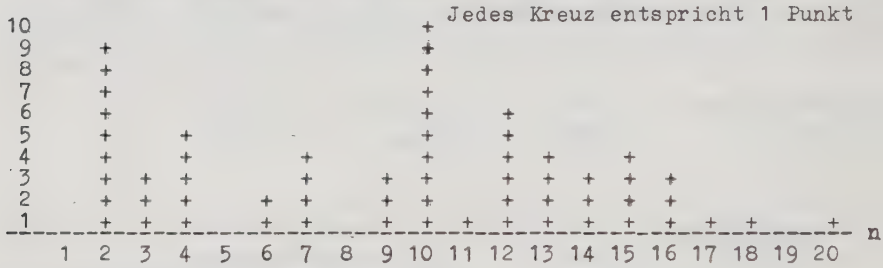
	Otosklerôseherd kein	fragl.	sicher
A. Steigbügelfußplatte			
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,44	0,68	0,54
Verteilung	--	--	--
wahrscheinlichster Wert (ng)	5,77	5,27	--
B. Steigbügelschenkel und -kopf			
Standardabweichung zu $\bar{x}$	0,51	0,46	0,25
Verteilung	----asymmetrisch-----		
wahrscheinlichster Wert	4,11	--	--

S I L B E R

B. STEIGBÜGELSCHENKEL UND -KOPF

KEIN OTOSKLEROSEHERD

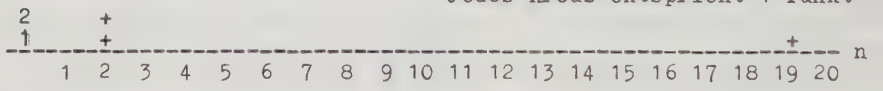
0 9 3 5 0 2 4 0 3 10 1 6 4 3 4 3 1 1 0 1



Klassengrenzen = 0,387(n - 1) + 0,817 (in ng)
Mittelwert : 3,8065 ± 1,9229 ng n = 60

FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD

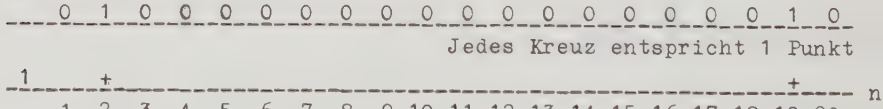
0 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0



Klassengrenzen = 0,182(n - 1) + 3,03 (in ng)
Mittelwert : 4,1233 ± 1,8937 ng n = 3

SICHERER OTOSKLEROSEHERD

0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0



Klassengrenzen = 0,019(n - 1) + 0,817 (in ng)
Mittelwert : 0,9885 ± 0,2425 ng n = 2

M A N G A N

A. STEIGBÜGELFUSSPLATTE

KEIN OTOSKLEROSEHERD

0	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Jedes Kreuz entspricht 1 Punkt

2		+																	
1		+	+	+		+	+											+	n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Klassengrenzen = 0,00351(n - 1) + 0,0171 (in ng)
Mittelwert : 0,0339 ± 0,0216 ng n = 7

FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD

0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0

2																		+	
1		+												+				+	n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Klassengrenzen = 0,00171(n - 1) + 0,0171 (in ng)
Mittelwert : 0,0379 ± 0,0145 ng n = 4

SICHERER OTOSKLEROSEHERD

0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

2		+																	
1		+							+									+	n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Klassengrenzen = 0,00885(n - 1) + 0,0036 (in ng)
Mittelwert : 0,0611 ± 0,0756 ng n = 4

B. STEIGBÜGELSCHENKEL UND -KOPF

KEIN OTOSKLEROSEHERD

1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

1	+		+																+	n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Klassengrenzen = 0,006(n - 1) + 0,002 (in ng)
Mittelwert : 0,0402 ± 0,0606 ng n = 3

FRAGLICHER OTOSKLEROSEHERD

	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
1		+		+	+	+													+		n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	

Klassengrenzen = 0,00477(n - 1) + 0,024 (in ng)

Mittelwert : 0,0518 $\pm$ 0,0336 ng n = 5

SICHERER OTOSKLEROSEHERD

Für diese Gruppe konnten keine Mn-Werte gefunden werden

Kommentar

Bei Mangan läßt sich bezüglich Verteilungskurve und wahrscheinlichstem Wert nichts aussagen. Wie aus den Mittelwerten hervorgeht, liegt bei den wenigen Proben die gefundene Menge im Schnitt mit 40 pg an der Grenze der Empfindlichkeit des durchgeführten Verfahrens. Wie weit durch eine verbesserte Auswertetechnik z.B. durch direkte Emissionsmessung genauere Informationen gewonnen werden können, sei dahingestellt.

Nach den vorliegenden Messungen ist das Manganvorkommen unabhängig vom Ort und vom Zustand des Stapes.

IV. DISKUSSION

Zur Untersuchung gelangten 119 Steigbügel stapedektomierter Patienten der hiesigen Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik, von denen insgesamt 917 Spektren gewonnen wurden. Jedes Präparat ergab durchschnittlich 3,235 Bruchstücke, auf jedes Bruchstück wurde im Mittel 2,382-mal geschoßen, wobei jewils unterschiedliche Areale eingestellt waren. Demnach ergeben 119 Operationspräparate 385 Bruchstücke, deren 917 Areale zur Auswertung kamen. Unterteilt in Klassen und Gruppen resultiert daraus das in Tab. 2 dargestellte Bild:

total					
889					
Fußplatten			Schenkel u. Köpfe		
581			308		
Otosklerose			Otosklerose		
keine	fragl.	sicher	keine	fragl.	sicher
293	119	169	266	21	21

Tab. 2: Verteilung der Knochenspektren

Obwohl in Tab. 2 die jeweils gruppenhöchsten Probenzahlen aufgeführt sind, ergibt sich eine Differenz von 28 Spektren, die dadurch begründet ist, daß manche Spektrallinien in den Bereich von Kratzern auf bzw. Verunreinigungen in der Emulsion oder in die Filmperforation zu liegen kamen. Eine gültige Messung war hier nicht mehr durchzuführen.

Weiter fällt auf, daß besonders bei den Spurenelementen die Fallzahlen weit unter die der Tab. 2 geraten.

Da diese Elemente jedoch in minimalen Konzentrationen auftreten, können sie nicht bei jedem Einschuß nachgewiesen werden, die Spektrallinie verschwindet im Filmuntergrund, ein Ausmessen ist nicht mehr möglich. Viele Werte befinden sich ohnehin dicht an der Grenze der noch möglichen Auswertung. Ob darin der Grund für die stark linksschräge Verteilung liegt, ist denkbar, kann aber mit einiger Wahrscheinlichkeit erst dann behauptet werden, wenn eine Normierung auf eines der Mengenelemente - Calzium oder Phosphor - erfolgt ist. Dieser Schritt muß jedoch einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben.

Daß zum Teil derart schwache Spektrallinien auftreten, liegt ursächlich wahrscheinlich darin begründet, daß das Untersuchungsgut keine homogene Struktur aufweist. Inhomogene Materialien pflegen bei plötzlicher großer Hitzeeinwirkung zu springen, gelegentlich sogar zu explodieren. So kann also auch bei der beschriebenen Versuchsanordnung durch den Laser-Beschuß ein relativ großer Trichter entstehen, die herausgeschossene Substanz muß jedoch nicht voll zur Entladung gekommen sein. Größere Partikel können die entstehende Ionenwolke passieren, ohne selber im ionisierten Stadium vorzuliegen. Zudem besteht beim Durchfliegen der Ionenwolke die Gefahr, Teile dieser mitzureißen und somit zu zerstören. Unabdingbare Folge ist ein viel zu schwaches Spektrum, das in keinem Verhältnis zu dem entstandenen Trichtervolumen steht.

Dieses Phänomen konnte nicht selten mit bloßem Auge beobachtet werden. Dabei zeigte sich, daß von dem Einschußpunkt glühende Partikel weit aus dem Fokus der Spektrographen-Sammellinse hinausgeschleudert wurden. Alle Versuche, den Knochen einzubetten, ihn

mit einer homogenen Matrix zu versehen, oder nur auf polierte Oberflächen zu schießen, brachten diesbezüglich keine besseren Resultate. Eine Korrelation von Trichtervolumen zu Linien-Intensität konnte also nicht gesichert werden. Tests mit Metallen, mit annähernd homogenen Materialien also, verliefen weitaus zufriedenstellender. Ebenso eignen sich weiche, elastische Proben erheblich besser.

Trotz dieser die Aussagekraft der Ergebnisse schmälernden Unsicherheitsfaktoren sind die Untersuchungen fortgeführt worden. Freilich, diese Arbeit offenbart keine eindeutigen Erkenntnisse, aber eine wesentliche Tendenz kann wohl hervorgehoben werden: Die deutliche Mineralanhäufung bei fast allen untersuchten Elementen in der Gruppe der fraglichen Herde gegenüber den sicher otosklerotischen und den sicher gesunden Steigbügeln. Zu welchen Schlußfolgerungen diese erstaunliche Feststellung berechtigt, kann vorläufig noch nicht abgeklärt werden. Weitere Experimente in dieser Richtung und die vollständige Auswertung der vorhandenen Daten lassen immerhin erwarten, daß sich in Zukunft klarere Verhältnisse ergeben werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem kurzen Abriß über die Bedeutung der Otosklerose wird nurmehr auf die Fragestellung des Themas und auf die Eigenarten der zur Beantwortung herangezogenen LASER - Mikrosonde eingegangen.

Es folgt eine eingehende Beschreibung der speziell hierfür entwickelten Präparationstechniken und Schritte zur Auswertung der gefundenen Meßdaten. Einen breiten Raum nimmt die Ermittlung von Eichkurven ein, die mit dieser Arbeit erstmalig gelingen konnte, und ohne die quantitative Untersuchungen mit der LASER - Mikrosonde nicht möglich waren und auch hier nicht möglich geworden wären.

Die Ergebnisse bezüglich der Mengen- und Spurenelemente in gesunden und otosklerotisch erkrankten Steigbügeln konnten augenscheinlich keine deutlichen Unterschiede aufdecken. In einer dritten Gruppe von Steigbügeln, die weder sicher als gesund noch sicher als erkrankt bezeichnet werden konnten, wurden die "fraglichen Herde" zusammengefaßt. Hier ließ sich eine deutliche, wenngleich statistisch nicht gesicherte Mineralanhäufung gegenüber den beiden anderen Gruppen aufzeigen. Auch dürften in dem vorhandenen Datenmaterial noch einige Informationen verborgen sein, die wegen ihres mathematisch-technischen Aufwandes späteren Veröffentlichungen vorbehalten bleiben müssen.

VI. SCHRIFTTUM

1) BARTH, Nikolaus — Der Laser und seine Anwendung in Naturwissenschaften, Medizin und Technik
Umschau in Wissenschaft und Technik 66 (1966), Seite 147 - 151

2) BARTH, Nikolaus — Der Laser und seine Anwendung in Naturwissenschaften, Medizin und Technik
Umschau in Wissenschaft und Technik 66 (1966), Seite 183 - 189

3) BERSIN, Theodor — Biochemie der Mineral- und Spurenelemente
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt, 1963

4) BOENNINGHAUS, H.-G., BECKER, V. — Oberflächenuntersuchung an Otosklerosknochen mit dem Elektronenmikroskop "Stereoscan"
Archiv klin. exper. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilk. 190, 319 - 329 (1968)

5) BRETLAU, P., M.B.JØRGENSEN — Histological Investigations of Otosclerotic Foci
Acta oto-laryngologica 63, 413 - 419 (1968)

6) FRIES, K. — Otosklerotische Veränderungen in der Fußplatte und den Schenkeln des Steigbügels
Dissertation, Würzburg, 1966

7) FLEISCH, H. — Physiologie und Biochemie der Knochenbildung
Klin. Wschr. 44 (1966), S.360 - 363

8) Documenta GEIGY — Wissenschaftliche Tabellen, 6.Auflage, 1960

9) GLICK, David, R.C.ROSAN — Laser Microprobe for Elemental Microanalysis, Application in Histochemistry
Microchemical Journal 10, 393-401 (1966)

10) GOLDMAN, H.M. et.al. — The Application of Laser Spectroscopy for the Qualitative and Quantitative Analyses of the Inorganic Components of Calcified Tissues
Oral Surg. 17, (1964), 102 - 103

11) JARRELL-ASH Comp.	Jarrell-Ash Bulletin 45-600 Jarrell-Ash Newsletter No. 14/1963, S.6
12) JUNG, H.	Über otosklerotisch veränderte Stapesfußplatten Dissertation, Würzburg, 1964
13) LEUTHARDT, F.	Lehrbuch der Physiologischen Chemie Walter de Gruyter & Co, Berlin, 14. Auflage, 1959
14) LITHWICK, N.H., et.al.	Micro-Analysis of Bone by Laser Microprobe Surg. Forum 15, (1964), 439 - 441
15) MERTZ, D.P., R.KOSCHNICK	Untersuchungen über den Stoffwechsel von Spurenelementen beim Menschen Z.f.Klin.Chemie u.Klin.Biochemie, 6, (1968), 171 - 174
16) MEURMAN, O.H., et.al.	The Crystallographic Structure and Mineralization of Otosclerotic Bone Acta oto-laryngologica 65, (1968), S. 9 - 12
17) MEURMAN, O.H., et.al.	X-Ray Crystallographic Studies of Otosclerotic Bone Acta oto-laryngologica 63, (1967), S. 110 - 113
18) MOENCKE-BLANKENBURG, Liselotte	Funktion und Einsatzmöglichkeit des Laser-Mikro-Spektralanalysators LMA 1 Mikrochimica Acta, Suppl.II, 1967
19) MOENCKE, H.	Vergleichende Betrachtung über Elektronenstrahl-Mikroanalyse und Laser-Mikro-Spektralanalyse Mikrochimica Acta, Suppl.II, 1967
20) PRINE, J.R. et.al.	Demonstration of the Presence of Beryllium in Pulmonary Granulomas The American Journal of Clinical Pathology, 43, (1966), 448 - 454
21) RAUEN, H.M., Hersg.	Biochemisches Taschenbuch Springer-Verlag, Berlin, 1956
22) SCHNEIDER, M.	Einführung in die Physiologie des Menschen Springer-Verlag, Berlin, 15. Aufl., 1964
23) JØRGENSEN, M.B. H.K.KRISTENSEN	Frequency of Histological Otosclerosis Annals of Otology, Rhinology & Laryngology, 76, 1967, 83 - 88
24) RÜEDI, L.	Otosclerotic Lesion and Cochlear Degeneration Arch.Otolaryng., 89, (1969), 364 - 371

25) RUNGE, E.F. Spectrochemical Analysis Using a Pulsed Laser Source
Spectrochimica Acta 20, (1964), 733 - 736

26) SATALOFF, J. Experimental Use of Laser in Otosclerotic Stapes
Arch. Otolaryng. 85, (1967), 614-616

27) SCHINDLER, K. Die Anwendung der Lasermikrosonde in der Otosklerosеforschung
Archiv klin.exp. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilk. Bd.188, Heft 2, (1967), Kongreßbericht 1967 (Bad Reichenhall), Teil II

28) TAL, E., K. GUGGENHEIM Effect of Manganese on Calcification of Bone
Biochem.J. (1965), 95, S. 94 - 97

29) WULLSTEIN, H.L. Operationen zur Verbesserung des Gehöres
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1968

Herrn Professor Dr. Wullstein gilt mein besonderer Dank für die freundliche Übertragung des Themas sowie für die grosszügigen Arbeitsbedingungen, die er mir an seiner Klinik gewährte.

Herrn Dr. K. Schindler gebührt mein aufrichtiger Dank für die zahlreichen Hilfen und Ratschläge, die er mir in seiner stets aufmunternden Art immer wieder erteilen konnte.

Herrn Dr. H. -G. Schmitt danke ich für seine vorbildliche Unterstützung bei der Verrechnung der Messergebnisse.

L E B E N S L A U F

Am 21. April 1943 wurde ich, Ekkehard Schlichtenhorst, als dritter Sohn des Zahnarztes Walter Schlichtenhorst und seiner Ehefrau Alice geb. Holtzendorff in Uelzen, Lüneburger Heide geboren.

Dort besuchte ich von 1949 bis 1953 die Volksschule und anschließend die beiden unteren Klassen der Oberschule für Jungen. Den Rest der Schulzeit verbrachte ich im Landerziehungsheim Stiftung Louisenlund bei Eckernförde, an dem ich am 6. März 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Sommersemester 1962 immatrikulierte ich mich an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg für das Studium der Medizin und Zahnheilkunde, widmete mich nach bestandenem Vorphysikum allerdings nur noch dem zahnmedizinischen Fach. Am 3. Mai 1965 legte ich das Physikum ab, das Staatsexamen bestand ich am 15. Dezember 1967.

Hiermit gebe ich die ehrenwörtliche Versicherung ab, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und neben der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Ekkehard Schlichtenhorst

Schnelldruck - Böhler, 87 Würzburg, Wirsbergstraße 10